



**Sofia Laura Ferreira
Leite**

**Caracterização de *Enterococcus* isolados de
berbigão na Ria de Aveiro**



**Sofia Laura Ferreira
Leite**

**Caracterização de *Enterococcus* isolados de
berbigão na Ria de Aveiro**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada, ramo de especialização em Microbiologia Clínica e Ambiental, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves, Investigador Auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro.

Dedico ao meu pai e à minha irmã pelo incansável apoio.
À minha mãe.

o júri

presidente

Prof. Doutor António José Arsénia Nogueira

professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Helena da Conceição Pereira Albano

investigadora em pós-doutoramento da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa

Prof. Doutor Artur Jorge da Costa Peixoto Alves

investigador auxiliar do Departamento de Biologia e CESAM da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Em primeiro lugar, agradeço ao meu orientador Dr. Artur Alves pela dedicação demonstrada, pelo apoio ao longo de todo o trabalho, por todos os conhecimentos transmitidos e por toda a paciência manifestada.

Aos meus colegas de laboratório pelo bom ambiente no trabalho e por nunca se negarem a tirar as minhas inúmeras dúvidas.

A todos os meus amigos em especial à Elsa, à Carina, ao Bruno, ao Ademar, à Catarina, à Marta e à Inês por todo o apoio e por terem a capacidade de transformar todas os meus devaneios em sorrisos.

Ao Nuno por estar sempre presente, nos momentos que descarreguei as minhas insatisfações e inquietações até aos das pequenas conquistas, e principalmente por me fazer sempre acreditar que era capaz.

Por último, de forma especial e nunca suficiente, agradeço ao meu pai e à minha irmã por tornarem esta etapa possível e por serem incondicionais.

palavras-chave

Enterococcus, berbigão, Ria de Aveiro, identificação, resistencia a antibióticos, reservatórios

resumo

Nas últimas décadas tem-se assistido a um aumento no interesse em enterococos que se deve em grande parte à sua utilização como probióticos efectivos e como culturas starter, e a sua presença em vários produtos alimentares fermentados. Outra característica importante é o facto de serem considerados agentes infecciosos importantes especialmente em hospedeiros imunocomprometidos. O objectivo principal deste estudo incidiu na caracterização de espécies de *Enterococcus* presentes em amostras de berbigões colhidas em 15 locais distintos da Ria de Aveiro, incluindo a identificação ao nível da espécie e avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

Foram identificados 200 *Enterococcus* spp. presentes nas amostras de berbigão. Procedeu-se à identificação dos isolados de acordo com os grupos de espécies: grupo *E. faecalis*, grupo *E. faecium* e grupo *E. casseliflavus*. Dos 200 isolados em estudo o grupo *E. faecium* foi o grupo predominante (60%), seguindo-se o grupo *E. faecalis* (32,5%) e por fim o menos representativo foi o grupo *E. casseliflavus* (7,5%). O maior número de isolados era originário do local 4 (n=79) e do local 9 (n=61). A avaliação da susceptibilidade a antibióticos foi realizada para todos os isolados usando o método de difusão em disco e de acordo com as normas de CLSI. Globalmente todos os 200 isolados mostraram elevadas percentagens de resistência aos antibióticos testados. As percentagens de resistências e resistências intermédias mais baixas corresponderam aos aminoglicosídeos gentamicina (9,5%) e estreptomicina (21,5%), à fosfomicina (9%), à teicoplanina (20,5%) e ainda ao beta-lactâmico penicilina (24,5%). Por outro lado as maiores percentagens de resistência foram detectadas para o macrolido eritromicina (98%), linezolid (91,5%) da classe oxazolidinona e ciprofloxacina (87%). De um modo global e comparando os 3 grupos de espécies, o grupo *E. faecium* apresenta as maiores percentagens de isolados resistentes para a maioria dos antibióticos em análise. Considerando os locais de amostragem o local 9 está associado a percentagens de resistência mais elevadas para cada um dos antibióticos.

Os resultados do presente estudo sugerem que os berbigões que se desenvolvem nas águas costeiras, nomeadamente na Ria de Aveiro, podem constituir potenciais reservatórios de *Enterococcus* multirresistentes a antibióticos, existindo a possibilidade de contribuírem para a sua disseminação e ainda de atingirem a comunidade por reentrarem na cadeia alimentar. As elevadas taxas de resistência a antibióticos de uso corrente no tratamento de infecções humanas e na produção animal suscitam preocupação e a necessidade de monitorização de ambientes aquáticos de elevada importância económica como o é a Ria de Aveiro.

keywords

Enterococcus, common cockle, Ria de Aveiro, identification, antibiotic resistance, reservoirs

abstract

The interest in enterococci has increased in the last few decades mainly due to their use as effective probiotics and starter cultures and their natural occurrence in various fermented foods. Other important characteristic is their ability to cause serious human infections, especially in immunocompromised hosts. The aim of this study focused on the characterization of *Enterococcus* species present in samples of common cockles taken from 15 different locations in Ria de Aveiro, including the identification of species levels and the evaluation of the susceptibility to antimicrobial agents.

200 *Enterococcus* spp. isolates were identified from common cockle samples. The isolates identification was performed according to the species groups: *E. faecalis* group, *E. faecium* group and *E. casseliflavus* group. In the 200 isolates the group *E. faecium* was predominant (60%), following by *E. faecalis* (32,5%) group and finally the less representative group it was *E. casseliflavus* group (7,5%). The largest number of isolates were collected from the site 4 (n=79) and 9 (n=61). The evaluation of the antibiotics susceptibility was performed for all the isolates by the disc diffusion method according to the CLSI rules. Generally all 200 isolates showed high resistances to antibiotics tested. The lower resistances and intermediate resistance percentages corresponds to the aminoglycosides gentamycin (9.5%) and streptomycin (21.5%), fosfomicin (9%), teicoplanin (20.5%) and to the beta-lactam penicillin (24.5%). On the other hand, the highest resistance percentages were detected for macrolid erythromycin (98%), linezolid (91.5%) and ciprofloxacin (87%). Comparing the 3 species groups, the group *E. faecium* reveals the highest percentage of resistant isolates for the majority of antibiotics in analysis. In relation to sampling sites, the site 9 was associated with the higher resistance percentages for all most antibiotics.

The results of this study suggests that common cockle that grow in coastal waters, namely in Ria de Aveiro, can be potential reservoirs of multi-resistant *Enterococcus*, and the possibility of contribution to dissemination and to reach the community by re-enter in food chain really exist. The high rates of resistance to antibiotics commonly used to treat human infection and in farm animals raise preoccupation and the need to monitoring the aquatic environment of high economic importance, like Ria de Aveiro.

Índice

Lista de Acrónimos e Abreviaturas	3
Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas	7
INTRODUÇÃO.....	9
1. O género <i>Enterococcus</i>	9
1.1 Características gerais do género	9
1.2 Taxonomia.....	10
1.3 Isolamento e identificação.....	11
1.4 Aplicações e funções	13
1.5 Resistência a antibióticos	17
2. Produção de berbigões na Ria de Aveiro.....	19
2.1 Berbigões como reservatórios de microrganismos patogénicos	19
2.2 Ria de Aveiro como local de produção de bivalves	20
3. Objectivos principais	21
MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4. Recolha das amostras.....	22
5. Purificação e confirmação dos isolados bacterianos	22
6. Extracção de DNA.....	24
7. Genotipagem por ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR).....	25
8. Análise dos perfis de genotipagem.....	25
9. Sequenciação do 16S rDNA	26
10. Análise filogenética	27
11. Identificação fenotípica	28
12. Testes de susceptibilidade a antibióticos	31
RESULTADOS	33
1. Identificação fenotípica e genotípica de <i>Enterococcus</i> spp. presentes nas amostras de berbigão.....	33
1.1 Recolhas das amostras de <i>Enterococcus</i> spp.....	33
1.2 Isolamento de <i>Enterococcus</i> spp.....	34
1.3 Identificação genotípica e análise da diversidade genética.....	34
1.4 Sequenciação do gene 16S rDNA e análise filogenética	38

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

1.5 Testes bioquímicos	41
1.6 Grupos de espécies de <i>Enterococcus</i> presentes nas amostras	42
1.7 Distribuição dos grupos de espécies pelos locais de amostragem	43
2. Avaliação da susceptibilidade a antibióticos	45
2.1 Resistências totais	45
2.2 Distribuição das resistências pelos locais de amostragem	50
2.3 <i>Enterococcus</i> multirresistentes.....	52
DISCUSSÃO.....	53
REFERÊNCIAS	66
ANEXO 1 -	77
ANEXO 2	85

Lista de Acrónimos e Abreviaturas

μL – Microlitro

μM - Micromolar

Al – Alumínio

ANOVA – Análise de variância

ARA – L-arabinose

AS – Aggregation Substance

ATP – Adenosina trifosfato

BPCs – Bifenilos policlorados

bp – pares de bases

Cd – Cádmio

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute

Cr – Crómio

Cu – Cobre

Cyl – Citolisina

DMF – Dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

ERIC - Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus

ETOH – Álcool etílico

GAL - Galactosidase

GelE – Gelatinase gene

GRE – *Enterococcus* resistentes a glicopéptidos

HAPs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

HCl – ácido clorídrico

HDL – High-Density Lipoprotein

Hg – Mercúrio

ITUs - Infecções do Tracto Urinário

MAN – Manitol

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mL - Mililitro

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina

NaCl – cloreto de sódio

Ni – Níquel

OF – Oxidation-Fermentation

PAI – Pathogenicity Island

PBPs - Penicilin-binding-proteins

PCR – Polymerase chain reaction

PFGE – Pulsed Field Gel Electrophoresis

RAPD – Randomly Amplified Polymorphic DNA

rRNA –Ácido ribonucleico ribossômico

SprE – Serine Protease

TAE - Tris-Acetato-EDTA

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

tRNA – Ácido ribonucleico de transferência

TSA - Tryptic Soy Agar

TSB - Tryptic Soy Broth

TTC – cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio

UPGMA - Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

UV – Ultravioleta

VP – Voges-Proskauer

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

VRE – *Enterococcus* resistentes a vancomicina

Zn – Zinco

Lista de Figuras

Figura 1- Mapa da Ria de Aveiro com os 15 locais de amostragem demarcados com o símbolo ★.	33
Figura 2- Imagem de um dos géis de agarose obtidos por electroforese dos produtos de ERIC-PCR.	35
Figura 3 - Dendrograma construído de acordo com as identificações dos 200 isolados de <i>Enterococcus</i> sp., usando o coeficiente de correlação de Pearson e o método UPGMA para a formação dos grupos ou <i>clusters</i>	36
Figura 4 - Árvore filogenética baseada nas sequências 16S rDNA dos 78 isolados de <i>Enterococcus</i> spp. seleccionados e 8 sequências de 16S rDNA das estirpes tipo. A estirpe de <i>Streptococcus pneumoniae</i> foi usada como <i>outgroup</i> na análise.	40
Figura 5 - Esquemas de testes bioquímicos utilizados (L-arabinose, Pigmentação amarela, Manitol e α -Galactosidase) para identificação dos 200 isolados em análise. Baseados em Manero e Blanch (1999).	41
Figura 6 - Percentagem dos grupos de espécies <i>E. casseliflavus</i> (7,5%), <i>E. faecium</i> (60%) e <i>E. faecalis</i> (32,5%) presentes nos isolados em estudo.	43
Figura 7 - Distribuição dos grupos de espécies de acordo com os 15 locais de amostragem. O grupo <i>E. faecalis</i> corresponde à cor magenta, o grupo <i>E. faecium</i> à cor laranja e o grupo <i>E. casseliflavus</i> à cor azul.	44
Figura 8 - Percentagens de resistências e resistências intermédias aos antibióticos em estudo para o total dos 200 isolados.	45
Figura 9 - a) Gráfico ilustrativo das percentagens de resistências para os 15 antibióticos avaliadas nos 65 elementos que constituem o grupo <i>E. faecalis</i> . b) Quadro auxiliar com os valores das percentagens de isolados resistentes (%R) para cada antibiótico.	46
Figura 10 - a) Gráfico ilustrativo das percentagens de isolados resistentes para os 15 antibióticos, avaliadas nos 120 elementos que constituem o grupo <i>E. faecium</i> . 9 b) Quadro auxiliar com os valores das percentagens para cada antibiótico.	47
Figura 11 - a) Gráfico ilustrativo das percentagens de resistências para os 15 antibióticos avaliadas nos 15 elementos que constituem o grupo <i>E. casseliflavus</i> . b) Quadro auxiliar com os valores das percentagens para cada antibiótico.	48
Figura 12 - Percentagens de isolados resistentes para os 15 antibióticos em análise, correspondentes aos isolados do local de amostragem 4 (n=79).	50
Figura 13 - Percentagens de isolados resistentes para os 15 antibióticos em análise, correspondentes aos isolados do local de amostragem 9.	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resultados positivos e negativos dos testes bioquímicos (MAN, ARA, α -Gal, Pigmentação) baseados em Manero e Blanch (1999) e correspondentes espécies de <i>Enterococcus</i>	29
Tabela 2 - Antibióticos utilizados para o método de difusão em agar de discos e respectiva classe.....	32
Tabela 3 - Tipos de contaminantes detectados nos locais de amostragem.....	34
Tabela 4 - Identificação dos isolados dos quais foi obtida sequência do 16S rDNA, com auxílio da ferramenta Eztaxon 2.1.....	38
Tabela 5 - Sequências de 16S rDNA de estirpes relacionadas às identificadas a partir das sequências dos 78 isolados seleccionados para sequenciação. Estas sequências foram retiradas da base de dados GenBank.	39
Tabela 6 - Resultados dos testes bioquímicos identificativos das espécies <i>E. casseliflavus</i> , <i>E. durans</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> e <i>E. gallinarum</i>	41
Tabela 7 - Identificações quanto à espécie dos 200 isolados, apenas de acordo com os testes bioquímicos executados.....	42
Tabela 8 - Para cada um dos 15 locais de amostragem foram registadas as percentagens de isolados resistentes a cada antibiótico em estudo.....	52

INTRODUÇÃO

1. O género *Enterococcus*

1.1 Características gerais do género

O género *Enterococcus* representa um grupo de bactérias complexo, bastante heterogéneo e de elevada importância ao nível da sua interacção com os humanos (Valenzuela *et al.*, 2009), incluindo mais de quarenta espécies diferentes associadas a animais e a plantas (Pangallo *et al.*, 2008). Enterococos são frequentes no tracto intestinal de animais de sangue quente, *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* são membros naturais da microbiota digestiva em humanos, variando em abundância (10^2 a 10^8 /g de conteúdo digestivo) de indivíduo para indivíduo e ao longo do tracto gastrointestinal (Ogier e Serror, 2008). No entanto, aparecem também associados a alimentos, água e solos, provavelmente devido a disseminação a partir de fontes fecais adicionada à sua tolerância natural a condições ambientais adversas (Giraffa, 2002).

O intestino de humanos e animais domésticos constitui o habitat comum associado à grande parte das espécies de *Enterococcus*, sendo que quando surgem fora do intestino são geralmente interpretados como indicadores de poluição fecal. No intestino humano as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são as mais frequentes. Por outro lado em aves, suínos e bovinos *E. faecium* surge em maior número, assim como *E. faecalis* e *E. cecorum*, em menor frequência aparece *E. gallinarum* e *E. durans*, *E. hirae* ou *E. avium* (Klein, 2003).

As espécies *E. mundtii* e *E. casseliflavus* estão geralmente associadas a plantas mas podem ocorrer de forma transitória no intestino de humanos e animais (Devriese *et al.*, 2006). Enterococos podem ser isolados de diversos habitats aquáticos desde águas residuais, ambientes marinhos costeiros e aquaculturas. Devido à sua capacidade para tolerar elevadas concentrações salinas os enterococos conseguem sobreviver por longos períodos em ambientes marinhos (Valenzuela *et al.*, 2010).

Estirpes deste grupo de microrganismos, essencialmente de *E. faecalis* são frequentemente utilizadas como indicadores de poluição fecal de águas. Outras estirpes distintas são usualmente empregues como aditivos em alimentos. No entanto podem também ser prejudiciais para os alimentos, causando a sua deterioração. Tal deve-se ao

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

facto de apresentarem uma elevada termotolerância e resistência à desidratação que por sua vez propicia a sobrevivência em alimentos cozinhados ou processados, levando ainda a que possam ser considerados como indicadores da qualidade sanitária de alimentos (Devriese *et al.*, 2006). Até ao momento vários estudos têm ainda revelado o potencial probiótico de diferentes estirpes de *E. faecium* e de *E. faecalis* para utilização em humanos e animais (Franz *et al.*, 1999; Franz *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2000).

Diferentes espécies de enterococos conseguem produzir uma grande variedade de bacteriocinas, designadas como enterocinas, que consistem em pequenos péptidos secretados por estes microrganismos e que possuem a capacidade de inibir um amplo espectro de patogénicos de origem alimentar e clínica (Moreno *et al.*, 2003).

Nas últimas décadas tem-se assistido a um aumento no interesse em enterococos que se deve em grande parte à sua utilização como probióticos efectivos e como culturas *starter* em vários produtos alimentares fermentados (Pangallo *et al.*, 2008). Outra característica importante é o facto de serem considerados agentes infecciosos importantes especialmente em hospedeiros imunocomprometidos. De facto apesar de até então serem considerados como inofensivos para o Homem os enterococos tornaram-se nas últimas décadas a segunda maior causa de infecções pós operatórias em meios hospitalares (Lopes *et al.*, 2005).

1.2 Taxonomia

Schleifer e Kilpper-Bälz (1984) descreveram pela primeira vez o género *Enterococcus*, correspondendo à descrição de *E. faecium* e *E. faecalis*. Até aqui as espécies *Streptococcus faecalis* e *Streptococcus faecium* eram atribuídas ao género *Streptococcus*. Sherman (1937) dividiu estreptococos em quatro grupos: os conhecidos como ‘enterococos’ ou estreptococos fecais, os estreptococos lácticos, o grupo viridans e o grupo dos estreptococos pyogenes. Mais tarde o termo viridans foi atribuído a estreptococos orais e enterococos a *Streptococcus* fecais. Foi então com Schleifer e Kilpper-Bälz apoiados em dados moleculares que o género *Streptococcus* se dividiu em três géneros distintos: *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Lactococcus*. A partir daqui foram descritas várias espécies de *Enterococcus*, sendo que actualmente são consideradas 40 espécies (Euzéby, 2011).

Em 2003 Klein dividiu as até então 22 espécies descritas em 7 grupos, baseando-se em dados do 16S rRNA: o grupo de *E. faecalis* que inclui *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus* e *E.*

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

moraviensis. *Enterococcus faecium*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. porcinus* e *E. villorum* pertencem ao grupo de *E. faecium*. Quanto ao grupo de *E. avium* este engloba as seguintes espécies *E. avium*, *E. pseudoavium*, *E. malodoratus* e *E. raffinosus*. O grupo *E. casseliflavus* inclui *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. flavescens*; o grupo *E. cecorum* as espécies *E. cecorum* e *E. columbae*; o grupo *E. dispar* as espécies *E. dispar* e *E. asini*, e por fim o grupo *E. saccharolyticus* inclui as espécies *E. saccharolyticus* e *E. sulfureus*. Para além destas foram também já descritas as espécies *E. seriolicida* (Kusuda *et al.*, 1991); *E. pallens* (Tyrrell *et al.*, 2002); *E. gilvus*, *E. ratti* e *E. solitarius* (Klein, 2003); *E. italicus* (Fortina *et al.*, 2004); *E. hermannienseis* (Koort *et al.*, 2004); *E. aquinarinus* e *E. devriesei* (Svec *et al.*, 2005); *E. canintestini* (Naser *et al.*, 2005); *E. caccae* (Carvalho *et al.*, 2006); *E. canis*, *E. phoenoculicola* e *E. saccharominimus* (Moreno *et al.*, 2006); *E. silesiacus* e *E. termitis* (Svec *et al.*, 2006); *E. camelliae* (Sukontasing *et al.*, 2007) e *E. thailandicus* (Tanasupawat *et al.*, 2008).

1.3 Isolamento e identificação

Relativamente ao isolamento de *Enterococcus* os meios mais usados em amostras de água, alimentos e outros materiais teste são o de Agar de Slanetz & Bartley e o de Agar de Azida Esculina Canamicina, ambos bastante selectivos e direccionados para detecção e enumeração de enterococos (Costa, 2006; Arvanitidou, 2001).

No caso do meio Slanetz & Bartley a triptose assegura os nutrientes essenciais para o crescimento bacteriano, o extracto de levedura é fonte de vitaminas, a glucose representa o hidrato de carbono fermentável fornecendo carbono e energia, o fosfato dipotássico actua como tampão, a azida de sódio inibe o crescimento de bactérias Gram negativas e o cloreto de trifeniltetrazóideo é reduzido a formazano por enterococos.

Como teste presuntivo positivo as colónias são transferidas para meio Agar de Azida Esculina Canamicina onde a caseína hidrolisada e o extracto de levedura fornecem nutrientes essenciais, o sulfato de canamicina e a azida sódica são os componentes selectivos inibitórios, a esculina e o citrato de amónio férrico juntos formam um sistema indicador para detectar hidrólise da esculina, o que resulta na formação de zonas pretas em volta das colónias (Slanetz & Bartley, 1957; Mossel, 1978).

As espécies que englobam os grupos de *E. faecium* e *E. faecalis* apresentam uma gama de características usadas para identificação fenotípica que as distinguem de outros cocos

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Gram-positivos, catalase-negativos, anaeróbios facultativos, nomeadamente a capacidade para crescer em meios com 6.5% de NaCl, a pH 9.6, a 10 °C e a 45 °C e ainda a presença de antígenos do grupo D.

Enterococcus faecalis apresenta a capacidade de reduzir fortemente trifeniltetrazolio cloreto (TTC), enquanto *E. faecium* não é capaz de o reduzir ou quando o faz é apenas fracamente (Klein, 2003). Existem ainda outras características que apesar de não serem específicas do género são comuns a quase todos os enterococos, dentre as quais o teste de VP (Voges-Proskauer ou reacção da acetoína) e de produção de ácido a partir da ribose. Todos os enterococos são positivos quanto a estes dois testes com excepção para *E. saccharolyticus* (VP-) e *E. asini* e ainda algumas estirpes de *E. casseliflavus* (ribose-). Os *Streptococcus* são sempre ribose-negativos e não são capazes de crescer em meios com 6.5% de NaCl (Devriese *et al.*, 2006).

Geralmente a identificação de espécies dentro do mesmo grupo é mais difícil e propensa a erros do que entre grupos. Deste modo, as identificações presuntivas baseadas em características de crescimento podem ser confirmadas considerando outros sistemas de identificação fenotípica que levam em consideração padrões de fermentação e características fisiológicas bem como actividades enzimáticas (Ogier e Serror, 2008). Os testes bioquímicos necessários para identificação e determinação de *Enterococcus* têm sido avaliados em vários estudos (Schleifer, 1987; Facklam *et al.*, 1989; Knudtson *et al.*, 1992; Devriese *et al.*, 1993; Manero e Blanch 1999), sendo considerados procedimentos confiáveis com quase todas as estirpes de *E. faecalis* e *E. faecium*, o mesmo não acontece em relação às restantes espécies (Devriese *et al.*, 2006).

A identificação de espécies de *Enterococcus* por testes fisiológicos/bioquímicos é sempre problemática devido à sua considerável diversidade fenotípica. Por outro lado, a identificação de espécies por testes convencionais requer normalmente longos tempos de incubação. Métodos com base molecular são essenciais como confirmação da identificação ou com fins de rápida identificação em microfloras heterogéneas. Sondas com o 16S e 23S rRNA como alvo são utilizadas com sucesso na identificação de diferentes espécies de *Enterococcus*, outros métodos como fingerprinting de proteínas, PCR-RAPD (randomly amplified polymorphic DNA), PFGE (pulsed field gel electrophoresis) e análises de enzimas de restrição são por sua vez utilizados para diferenciação intra-espécies (Klein, 2003).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

A utilização de métodos de identificação genotípica usando os genes 16S e 23S rRNA torna a identificação mais precisa e permitem a construção de árvores filogenéticas onde os grupos de espécies podem ser distinguidos (Devriese *et al.*, 2006).

No entanto persistem dificuldades de diferenciação de algumas espécies de *Enterococcus* (por exemplo *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* apresentam 99.8% de similaridade no seu 16S rRNA) (Ogier e Serror, 2008). Deste modo, métodos alternativos têm sido usados com sucesso nomeadamente: amplificação específica por PCR de espaços intergénicos de rRNA (Naimi *et al.*, 1997), genes D-Alanina-D-alanina ligase (*ddl*) e de resistência à vancomicina (*van*) (Kariyama *et al.*, 2000), gene da enzima de conversão da angiotensina (*ace*) (Duh *et al.*, 2001), gene da superóxido dismutase (*sodA*) (Jackson *et al.*, 2004); amplificação do gene regulador *Ef0027* (Liu *et al.*, 2005); sequenciação dos genes *ddl* (Ozawa *et al.*, 2000), gene da chaperonina 60 (*cpn60*) (Goh *et al.*, 2000) e gene da ATP sintetase (*atpA*) (Naser *et al.*, 2005) e ainda rep-PCR com o primer (GTG)₅ (Svec *et al.*, 2005) e ERIC-PCR com o primer ERIC1-R (Valenzuela *et al.*, 2010).

1.4 Aplicações e funções

Enterococos ocorrem frequentemente numa grande variedade de produtos alimentares fermentados desde leite, queijos, carne e vegetais (Valenzuela *et al.*, 2009) que se deve em grande medida ao facto de não possuírem cadeia respiratória nem Ciclo de Krebs o que os torna fortes fermentadores comumente usados na indústria alimentar (Klein, 2003).

Na produção de queijos os enterococos desempenham um papel importante no seu amadurecimento e nos processos de retenção de aroma e sabor característicos (Devriese *et al.*, 2006). Em determinados tipos de queijo dominam as espécies de *E. faecium* e *E. faecalis*, em outros tipos são as bactérias lácticas que estão presentes em maior número, mas mesmo nestas variedades os enterococos representam uma importante parte da flora destes produtos alimentares. São as propriedades como a actividade proteolítica, produção de acetaldeído, acetoína e diacetil, acrescentando a possibilidade de actividade de esterase na gordura do leite que tornam benéfica a sua utilização para produção destes alimentos (Devriese *et al.*, 2006).

Para além destas propriedades tecnológicas, muitas estirpes de enterococos principalmente *E. faecalis* e *E. faecium* podem produzir uma grande variedade de bacteriocinas activas contra patogénicos transmitidos por alimentos como *Bacillus cereus*,

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Clostridium spp., *Listeria monocytogenes* ou *Staphylococcus aureus*. Deste modo, o uso de enterocinas ou de estirpes produtoras de enterocinas como culturas *starter*, durante a fermentação de alimentos, tem recebido uma atenção especial como método preventivo para controlo de bactérias patogénicas emergentes (Valenzuela *et al.*, 2009).

Nos últimos anos tem se assistido ao desenvolvimento de vários estudos relativos à produção de bacteriocinas por *Enterococcus*, principalmente em *E. faecium* associados a alimentos (Giraffa, 2003) uma vez que a sua aplicação pode ser considerada como uma forma segura e natural de preservação de alimentos (Pinto *et al.*, 2009). Num estudo levado a cabo por Pinto (2009) o espectro antimicrobiano observado para bacteriocinas produzidas por uma estirpe de *E. faecium* isolada de moluscos (bacALP7) incluiu vários géneros de bactérias Gram positivas, sendo realçado o seu elevado nível de actividade inibitória contra *Listeria monocytogenes*, um patógeno emergente responsável por causar listeriose em humanos através da ingestão de alimentos contaminados com o mesmo (Mena *et al.*, 2004).

Enterococos são também usados como probióticos para humanos e animais. Segundo Franz (2003) os probióticos podem ser definidos como monoculturas ou culturas mistas de microrganismos vivos que quando ingeridos podem afectar de forma positiva, causando melhorias nas propriedades da flora endógena do hospedeiro.

Os efeitos funcionais associados aos probióticos incluem inibição de microrganismos patogénicos, fortalecimento da barreira mucosa intestinal, actividades antimutagénicas e anticarcinogénicas, estimulação do sistema imunitário e diminuição dos níveis de colesterol no sangue.

Geralmente as culturas probióticas são constituídas por espécies que fazem parte do habitat intestinal e pertencem principalmente aos géneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* mas também *Enterococcus*.

A estirpe SF68 de *E. faecium* é uma das mais estudadas quanto à sua actividade probiótica, na medida que tem sido usada para o tratamento da diarreia em crianças e adultos e é considerada como uma alternativa ao tratamento com antibióticos (Franz *et al.*, 1999).

Na Dinamarca é comercializado um leite fermentado (Gaio) contendo uma estirpe específica de *E. faecium* e que é usado como probiótico. A cultura Causido® que consiste em duas estirpes de *S. thermophilus* e uma de *E. faecium* constitui outro uso probiótico de

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Enterococcus sendo que já fora comprovado o seu efeito na redução a curto prazo dos níveis de colesterol HDL. No entanto o seu uso clínico permanece incerto uma vez que ainda não fora demonstrado o seu efeito a longo prazo (Sessions *et al.*, 1997). O uso de enterococos como probióticos ou como culturas *starter* no fabrico de queijos permanece envolto em controvérsia uma vez que está latente o risco de transferência de resistências a antibióticos e genes de virulência a estirpes da microbiota do tracto gastrointestinal humano. No Canadá em 2004 o uso de enterococos como probiótico foi banido como resposta a estes riscos associados e ainda não totalmente esclarecidos (Ogier e Serror, 2008).

Estudos recentes têm documentado a emergência de enterococos como importantes patogénicos humanos, constituindo uma das principais causas de infecções nosocomiais, e ainda o seu envolvimento em casos de endocardite, bacteremia, infecções do tracto urinário e sepsia neonatal (Valenzuela, *et al.*, 2010). Enterococos constituem a terceira maior causa de infecções sanguíneas nosocomiais nos E.U.A e a quarta na Europa (Ogier e Serror, 2008).

As infecções por *Enterococcus* são causadas essencialmente por *E. faecalis* (80%) e *E. faecium* (20%), outras espécies como *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* ou *E. raffinosus* são menos frequentes em infecções deste tipo. Geralmente inofensivos em indivíduos saudáveis, tornam-se patogénicos principalmente em indivíduos em unidades de cuidados intensivos e em pacientes hospitalizados com doenças graves, doentes imunocomprometidos ou ainda em idosos. Também são frequentes em infecções polimicrobianas intra-abdominais, surgindo associados a outros patogénicos o que dificulta o esclarecimento sobre o seu papel na infecção. No entanto são já reconhecidos como causas principais de infecções do tracto urinário, bacteremia, endocardite e complicações pós-operatórias, constituindo a sua segunda maior causa tanto nos E.U.A. como na Europa.

Algumas das fontes para bacteremia enterocócica incluem a translocação de enterococos através da barreira epitelial do intestino, via intravenosa, abscessos e ainda infecções do tracto urinário. A mortalidade associada a bacteremia enterocócica está relacionada com factores de risco como severidade da doença, idade e uso de antibióticos de amplo espectro como cefalosporinas e metronidazol. A bacteremia enterocócica pode conduzir a endocardite que constitui a infecção enterocócica com o tratamento mais desafiador e que se encontra associada a aumento de mortalidade. A seguir a estreptococos,

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

os enterococos (essencialmente *E. faecalis*) são responsáveis por 5 a 20% dos casos de endocardite. De um modo global as infecções enterocócicas estão associadas a uma mortalidade que ronda os 20 a 30% na medida em que representam um importante problema de saúde pública e acrescentando o facto de se tratem de patógenos hospitalares acabam por ter um impacto directo e significativo, uma vez que podem causar o prolongamento de hospitalizações e a aplicação de tratamentos terapêuticos adicionais (Ogier e Serror, 2008).

Nas últimas décadas as infecções por enterococos têm-se tornado um grande desafio terapêutico devido a um aumento na sua incidência e na disseminação de estirpes que adquiriram resistência a diversos agentes antimicrobianos. Tem-se assistido a uma crescente consciência da ocorrência de enterococos multiresistentes, particularmente em isolados de pacientes em hospitais (Pangallo *et al.*, 2008), sendo que *E. faecium* tem atraído uma atenção crescente devido à sua capacidade para adquirir determinantes de resistência múltipla a antibióticos. No entanto, apesar de já ser reconhecido que as fontes ambientais podem contribuir para a disseminação de enterococos resistentes a antibióticos ainda pouco se sabe acerca da distribuição e epidemiologia de enterococos isolados destas fontes ambientais (Arvanitidou *et al.*, 2001).

A presença no ambiente de estirpes de enterococos que exibem resistências a antibióticos pode ser de particular interesse na medida da possibilidade de uma relação entre as infecções adquiridas na comunidade e as actividades recreativas.

Enterococcus faecalis e *E. faecium* são consideradas como mais específicas para o Homem e sobrevivem por períodos de tempo mais longos em ambientes aquáticos; predominam igualmente ao nível das resistências a antibióticos em enterococos de vários habitats aquáticos (Lauková e Juris, 1997).

Os aumentos significativos de bactérias com múltiplas resistências a antibióticos observadas em vários sistemas aquáticos podem ter um grande impacto ao nível da saúde humana uma vez que as infecções provocadas por estes organismos são usualmente difíceis de tratar com recurso a medicação (Valenzuela, *et al.*, 2010).

A relevância das infecções enterocócicas deve-se especialmente ao seu nível elevado de resistências, intrínsecas e adquiridas, a antibióticos. Especificamente, as infecções nosocomiais com estirpes multiresistentes (Moreno *et al.*, 2006).

1.5 Resistência a antibióticos

O uso massivo de antibióticos tanto na agricultura (como promotores de crescimento animal) como no sistema de cuidados de saúde humana é considerado o principal responsável pelo aumento da incidência de enterococos resistentes a antibióticos. A emergência destes agentes resistentes pode afectar o sucesso do tratamento de vários tipos de infecções e aumentar o risco de disseminação posterior destes organismos resistentes para outros pacientes e para a comunidade (Lopes *et al.*, 2005).

O grupo dos enterococos apresenta resistência intrínseca a vários agentes antimicrobianos tais como cefalosporinas, lincosaminas e níveis reduzidos de penicilinas e aminoglicosídeos (Johnston e Jaykus, 2004) e ainda a capacidade para adquirir facilmente resistências a antibióticos de uso clínico.

O alto nível de resistência a uma extensa gama de antibióticos juntamente com a presença de factores de virulência reforça o potencial de enterococos como oportunistas efectivos de infecções nosocomiais (Lopes *et al.*, 2005).

Uma das características de maior interesse é a resistência demonstrada contra glicopéptidos, sendo estes utilizados como antibióticos de último recurso para combater infecções nosocomiais severas de hospedeiros geralmente imunocomprometidos, nos quais a administração de penicilina não se mostrou efectiva. Em particular, enterococos resistentes a vancomicina (VRE) constituem um grave problema no tratamento de infecções humanas, uma vez que a vancomicina é usada como tratamento de último recurso. A resistência à vancomicina pode ser intrínseca (*vanC*) ou adquirida (*vanA*, *vanB*, *vanD*, *vanE*, *vanG*). Os fenótipos resistentes à vancomicina mais frequentes são *vanA*, associados a elevados níveis de resistência a vancomicina e teicoplanina, e *vanB*, que apresenta níveis variáveis de resistência induzida a vancomicina. Nos E.U.A. a incidência de infecções sanguíneas por VRE rondava os 0.4% em 1989, passando a 25.2% em 1999, sendo aceite que a sua emergência deveu-se ao uso massivo de antibióticos a nível hospitalar. Em relação ao continente europeu a prevalência de VRE varia entre os diferentes países, sendo que é considerada significativamente elevada na Itália e no Reino Unido (Ogier e Serror, 2008).

Outros glicopéptidos como a avoparcina são utilizados ainda hoje como promotores de crescimento em rações animais. O uso de avoparcina na pecuária foi associada ao

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

aparecimento de isolados de VRE em diferentes fontes animais, sugerindo-se ainda a ocorrência de transferência de genes entre animais e humanos, por contaminação ao nível da cadeia alimentar. A presença de clusters de gene *vanA* genotipicamente indistinguível em isolados de VRE de fontes humanas e não humanas, a par da diminuição das taxas de colonização de VRE na Europa após a proibição do uso de avoparcina na pecuária são factos que fundamentam o efeito deste antibiótico.

O uso de avoparcina como promotor de crescimento foi banido na Comunidade Europeia depois da sua utilização como aditivo ter sido associada ao aparecimento de enterococos resistente à vancomicina em animais domésticos (Ogier e Serror, 2008).

Os enterococos resistentes a glicopéptidos (GRE) podem de facto ser introduzidos na cadeia alimentar e dessa forma serem transferidos para o intestino humano. Por conjugação os GRE podem ainda transferir essa resistência para outras bactérias da microflora intestinal, o que constitui por si só um risco acrescido. Foi também já demonstrada a ocorrência de enterococos resistentes a vancomicina (VRE) em alimentos de origem animal (Klein, 2003).

A transferência de resistências a glicopéptidos entre estirpes de enterococos através de conjugação tem um impacto considerável nas resistências de enterococos no tracto intestinal humano. De realçar ainda que a frequência de transferências de resistências bem sucedidas a estirpes clínicas de enterococos é consideravelmente superior comparativamente a isolados de alimentos ou que actuam como probióticos. Deste modo, é considerado improvável a ocorrência de transferências nos enterococos autóctones da microflora normal do tracto gastro-intestinal humano (Klein, 2003).

Apesar de ainda não ter sido demonstrada a relação entre a ingestão de alimentos contendo enterococos e infecções em humanos foram já encontrados os mesmos genes de resistência em bactérias isoladas de queijos não pasteurizados e de pacientes humanos, o que suporta a hipótese de que os enterococos transportados nos alimentos podem de facto colonizar humanos ou efectuar trocas de genes de resistência a antibióticos com bactérias que colonizam humanos (Lopes *et al.*, 2005).

Durante os últimos anos, vários estudos têm demonstrado a ocorrência de transferência de genes de resistência usando vários modelos de conjugação dentre os quais em condições laboratoriais entre isolados clínicos, comensais, alimentares e probióticos; em matriz de

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

alimentos e em ratinhos gnotobióticos. Recentemente num estudo levado a cabo por Mater e seus colaboradores (2005) foi reportada pela primeira vez que a transferência do cluster gene *vanA* pode ocorrer entre estirpes de *Enterococcus* que fazem parte da microbiota do tracto digestivo humano. A transferência de resistência a espécies com maior grau de patogenicidade representa outro problema grave que deve ser alvo de estudos aprofundados. Em 1992 Noble demonstrou a ocorrência de transferência de *E. faecalis* para *S. aureus* e ainda para espécies de *Listeria*. Actualmente sabe-se que essa transferência teve a sua contribuição no aparecimento de *S. aureus* resistentes a vancomicina e a meticilina.

Deste modo, é de relevante importância a monitorização destes tipos de resistências transferíveis por *Enterococcus* (Ogier e Serror, 2008), tornando-se indispensável a detecção da presença de resistências a glicopéptidos antes da aplicação de estirpes de *Enterococcus* como culturas *starter* ou probióticos nos alimentos, uma vez que quando presentes não se pode excluir a possibilidade de ocorrência de transferência dessas resistências para outras estirpes (Klein, 2003).

2. Produção de berbigões na Ria de Aveiro

2.1 Berbigões como reservatórios de microrganismos patogénicos

Segundo Sadowsky e Domingo (2007) os bivalves representam uma comunidade valiosa tanto como fonte alimentar como produtos que sustentam uma importante indústria, os ecossistemas costeiros; consequentemente a contaminação de bivalves que se desenvolvem nestes ambientes pode criar contrangimentos ao nível económico e de saúde pública. De realçar que os bivalves constituem um recurso de enorme importância socioeconómica para as comunidades litorais, situadas ao longo de toda a costa continental portuguesa (Monteiro, 2004).

A contaminação de bivalves ocorre principalmente devido ao facto de se tratar de filtradores selectivos de pequenas partículas de fitoplâncton, zooplâncton, vírus, bactérias e matéria inorgânica das águas circundantes. Muito frequentemente os bivalves desenvolvem-se próximos de descargas de águas residuais ou em sistemas estuarinos poluídos (Oliveira *et al.*, 2011). Como resultado podem bioacumular microrganismos

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

patogénicos de origem fecal animal e humana (Crocì *et al.*, 2001) em concentrações muito superiores às verificadas na coluna de água, o que cria um risco potencial para os consumidores de bivalves tradicionalmente crus ou apenas ligeiramente cozinhados (Sadowsky e Domingo 2007). Em acréscimo a sua flora microbiológica pode constituir um reflexo do meio aquático no qual se desenvolvem (Monteiro, 2004).

As fontes de contaminação fecal humana e animal incluem resíduos de animais, chuvas intensas e fluxos de rios. Descargas não controladas de esgotos, escoamentos de contaminantes derivados de actividades agrícolas podem produzir por sua vez contaminação esporádica (Oliveira *et al.*, 2011). Deste modo, os bivalves eventualmente podem estar também a ser expostos a resíduos de antibióticos e a patogénicos multirresistentes, sendo que estes podem reentrar na cadeia alimentar através do consumo destes moluscos (Lees, 2000).

Os bivalves concentram microrganismos nos seus tecidos através do processo de filtração das águas circundantes e são reconhecidos como reservatórios de vários microrganismos patogénicos (Lee *et al.*, 2003). Para além de acumular naturalmente microrganismos como *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, e as suas formas patogénicas, estes bivalves são igualmente propensos à contaminação por patogénicos fecais como *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli* e vírus entéricos (Wilson e Moore, 1996).

2.2 Ria de Aveiro como local de produção de bivalves

Em Portugal agentes como o aumento da densidade populacional, a ausência de meios eficazes para o tratamento da poluição urbana, agrícola e industrial, bem como a inexistência de um sistema de vigilância eficaz traduziu-se ao longo dos tempos na contaminação dos estuários, entre os quais se inclui a Ria de Aveiro (Monteiro, 2004).

A actividade mais importante na Ria de Aveiro, relacionada com a exploração dos recursos haliêuticos, é a apanha de bivalves, entre os quais o berbigão, o mexilhão, amêijoia-boia, amêijoia-macha e longueirão. Os bancos de bivalves situam-se principalmente na parte central da laguna, em particular nas zonas mais próximas da barra. A captura é realizada por profissionais que usam embarcações, apanhadores não licenciados (actua-

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

apeados e utilizam regularmente pequenos instrumentos), mergulhadores não licenciados e ainda, veraneantes que praticam a apanha como actividade lúdica (Sobral *et al.*, 2000).

A qualidade destas águas costeiras é influenciada por diversos factores, tais como o fluxo dos rios, condições climáticas, estágio tidal, fluxos e correntes do oceano, fontes de poluição humana e ainda a configuração da linha costeira. A poluição da Ria de Aveiro deriva de múltiplas actividades de natureza industrial e agrícola e do crescimento populacional ao longo dos seus canais, sendo que a poluição de origem fecal contribui para a eutrofização do ecossistema com implicações na qualidade sanitária, especialmente no que diz respeito aos bivalves que aqui crescem, se reproduzem e são capturados para consumo humano (Alcântara e Almeida, 1988).

3. Objectivos principais

Como referido anteriormente *Enterococcus* constitui um grupo de microrganismos com diversas aplicações tecnológicas, sendo reconhecida a utilização de algumas estirpes como probióticos e como culturas *starter* e outras ainda como indicadoras de poluição fecal. No entanto, nas últimas décadas tornou-se num importante patogénico sendo uma das principais causas de infecções nosocomiais em todo o mundo. Assim é de elevada importância a caracterização destes microrganismos, incluindo a análise de resistências a antibióticos de importância alimentar e clínica.

Deste modo procedeu-se à caracterização de *Enterococcus* isolados a partir de berbigões da Ria de Aveiro, recolhidos em diferentes locais de amostragem nos quais foram detectados diferentes tipos de contaminações, desde hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAPs), bifenilos policlorados (BPCs) e metais pesados como mercúrio (Hg) e cádmio (Cd). De tomar em consideração igualmente que apenas algumas publicações foram direccionadas para isolados “ambientais” de *Enterococcus* em comparação com o elevado número de artigos relacionados com isolados clínicos (Pangallo *et al.*, 2008).

O objectivo principal deste estudo incidiu então na caracterização de espécies de *Enterococcus* presentes nas amostras de berbigões recolhidas de 15 locais distintos da Ria de Aveiro, incluindo a identificação ao nível da espécie e avaliação da susceptibilidade a agentes antimicrobianos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. Recolha das amostras

Num estudo prévio, amostras de berbigão (*Cerastoderma edule* L.) foram recolhidas em 15 locais diferentes da Ria de Aveiro, Portugal. Em cada local foram detectados contaminantes distintos. Nomeadamente, no local 6 foi detectada contaminação por HAPs, no local 7 por BPCs. Os locais 6, 8, 10, 11, 12 e 15 encontravam-se contaminados com mercúrio (Hg) e em todos os 15 locais foi detectada contaminação com alumínio (Al), crómio (Cr), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn) e cádmio (Cd).

As amostras recolhidas foram sujeitas a análises microbiológicas no âmbito de um outro trabalho. Destas análises foi obtido um total de 200 isolados presumivelmente pertencentes ao género *Enterococcus* que foram armazenados a -80° C em meio TSB contendo 20% de glicerol.

5. Purificação e confirmação dos isolados bacterianos

Os 200 isolados armazenados em glicerol 20% foram inicialmente submetidos a incubação por 48 horas a 37°C em meio de cultura Slanetz & Bartley (Merck, Alemanha) onde as colónias vermelho escuro ou rosa claro são indicativas de *Enterococcus* spp. Foi seleccionada uma colónia de cada isolado e transferida para meio Agar de Azida Esculina Canamicina (Merck, Alemanha). Ao fim de 24 horas de incubação a 37 °C os isolados foram confirmados como *Enterococcus* spp. a partir da mudança do meio para cor preta, como resultado da hidrólise da esculina por estas bactérias (Hurst *et al.*, 2007). Numa etapa final de isolamento uma colónia de cada isolado foi transferida para meio TSA (Merk, Alemanha) ao fim de 24h de incubação a 37°C.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Composição dos meios utilizados para isolamento em g/L:

Meio Slanetz & Bartley

Triptose 20,0
Extracto de levedura 5,0
D (+) Glucose 2,0
Fosfato dipotássio de hidrogénio 4,0
Azida de sódio 0,4
Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio 0,1
Agar-agar 10,0 (pH final 7.2 ± 0.2)

Meio Agar de Azida Esculina Canamicina

Peptona de caseína 2,0
Extracto de levedura 5,0
Cloreto de sódio 5,0
Citrato de sódio 0,15
Sulfato de canamicina 0,02
Esculina 1,0
Citrato de amónio e ferro (III) 0,5
Agar-agar 15,0 (pH final 7.0 ± 0.2)

Meio TSA

Peptona de caseína 17,0
Peptona de soja 3,0
D (+)-Glucose 2,5
Cloreto de sódio 5,0
Dipotássio hidrogenofosfato 2,5
Agar-agar 12,0 (pH final 7.1 ± 0.5)

Nota: Todos os meios, com excepção do meio Slanetz & Bartley, foram esterilizados por autoclavagem a 121°C por 15 min logo após a sua preparação.

6. Extracção de DNA

A extracção de DNA genómico foi efectuada segundo uma adaptação do protocolo do kit de purificação de DNA genómico *Genomic DNA Purification Kit* (Fermentas). As células de *Enterococcus* utilizadas no processo de extracção foram obtidas após crescimento em meio de cultura TSA por 24h a 37°C.

Genomic DNA Purification Kit - Protocolo

1. Recolher as células em meio TSA com um palito estéril e ressuspender em 50 µL de tampão TE (TE (10X) – 100mM Tris / 10mM EDTA).
 2. Adicionar 5 µL de solução de lisozima (40 mg/mL) e incubar a 37°C durante 1 hora.
 3. Acrescentar 50 µL de solução de lise e incubar durante 10 minutos a 65°C.
 4. Adicionar 100 µL de clorofórmio e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos, remover no final a fase aquosa para um novo microtubo.
 5. Adição 100 µL de isopropanol e centrifugar a 13.000 rpm por um período de 10 minutos.
 6. Descartar o sobrenadante e proceder à lavagem do *pellet* com 100 µL de ETOH a 70%, centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos.
 7. Por fim desprezar o sobrenadante e o DNA, após um período de secagem à temperatura ambiente, solubilizar em 50 µL de tampão TE.
 8. Armazenar a -20°C até posterior utilização.
-

Os produtos de extracção de DNA total foram analisados através de uma electroforese horizontal em gel de agarose a 0.8%. As amostras foram separadas tendo como referência um marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix 100-10000 pb (Fermentas). A electroforese prosseguiu durante um período de 1h a 80V, ao fim da qual os géis foram corados numa solução de brometo de etídio (5µg/mL). Os géis resultantes foram observados num transiluminador UV (Gel Doc, Bio-Rad) e fotografados para análise da qualidade do DNA genómico.

7. Genotipagem por ERIC-PCR (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR)

O protocolo de tipagem por ERIC-PCR baseou-se em Versalovic *et al.* (1994). As reacções foram realizadas num volume total de 25 µL contendo: 11,15 µL de água destilada, 1,25 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido) (Eurobio), 3 µL de MgCl₂ (25 mM, Promega), 5 µL de tampão de reacção (5x Green GoTag Flexi Buffer, Promega), 1,5 µL de dNTP's (2 mM dNTP Mix, Fermentas) e 1 µL de cada primer (ERIC1R 5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTCA; ERIC2 5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') (Sigma), 0,1 µL de DNA polimerase 5U/uL (GoTaq, Promega) e 1 µL de DNA molde. O programa de amplificação (Mycycler thermal cycler, BIO-RAD) consistiu numa etapa inicial de desnaturação a 95 ° C por 3 minutos, seguindo-se 30 ciclos: desnaturação a 94 ° C por 1 minuto, hibridação dos primers a 52 ° C por 1 minuto e extensão a 65 ° C por 8 minutos, e uma extensão final a 65 ° C por 16 minutos.

Os produtos de amplificação foram analisados por electroforese horizontal em gel de agarose a 1,5% usando o marcador de peso molecular Gene Ruler DNA Ladder Mix (Fermentas). A electroforese decorreu por um período de 2 horas e 45 minutos a 80 V em tampão de electroforese 1 x TAE (a partir de uma solução stock 50x: 40mM Tris base, 40 mM acetato, 2 mM EDTA, pH 8) (Sigma). Os géis foram corados numa solução de brometo de etídio (5 µg/mL; Sigma) e fotografados num transiluminador UV (Gel Doc, Bio-Rad).

8. Análise dos perfis de genotipagem

Os perfis de bandas foram analisados com recurso ao software GelCompar II (Applied Maths). Os géis foram normalizados utilizando o marcador de peso molecular e ambas as extremidades do gel. A opção “rolling disk” foi utilizada para subtracção do “background”.

As bandas de DNA foram detectadas pelo software e cuidadosamente verificadas por inspecção visual de modo a corrigir detecções insatisfatórias. Os níveis de similaridade entre perfis foram calculados usando o coeficiente de Pearson gerando uma matriz de similaridade. A partir desta matriz foi gerado um dendrograma pelo método UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages).

9. Sequenciação do 16S rDNA

Para amplificação do gene 16S rDNA foram seleccionados 78 isolados de *Enterococcus* spp. de acordo com os agrupamentos formados no dendograma e de forma a ser possível a identificação da totalidade dos isolados. No que diz respeito a este procedimento foi realizada uma reacção PCR, na qual para um volume final de 25 µL foram utilizados 12,15 µL de água destilada, 1,25 µL de DMSO (Eurobio, França), 3 µL de MgCl₂ (25 mM, Promega), 5 µL de tampão de reacção (5x Green GoTaq Flexi Buffer, Promega), 0,5 µL de dNTP's (2 mM dNTP Mix, MBI Fermentas), 1 µL de primer 27F (5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) (Angeleti *et al.*, 2001) e 1492R (5'-TACCTTGTTACGACTT) (Sakai *et al.*, 2003), 0,1µL de DNA polimerase 5U/µL (GoTaq, Promega) e por fim 1µL de DNA molde. A amplificação foi realizada num termociclador (Mycycler thermal cycler, BIO-RAD) de acordo com o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos seguida de 30 ciclos de: 94°C por 1min, 55°C por 1 min e 72°C por 2 minutos; e uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos resultantes foram analisados por electroforese horizontal em géis de agarose a 1% tendo sido utilizado o marcador de peso molecular Gene Ruler 100bp DNA Ladder plus (Fermentas). A electroforese decorreu durante 1 hora a 80V e os géis resultantes foram corados numa solução de brometo de etídio e visualizados num transiluminador UV (Gel Doc, Bio-Rad).

Numa fase seguinte procedeu-se à purificação dos amplicões para serem posteriormente sequenciados pela empresa GATC (Alemanha). O procedimento de purificação de DNA foi seguido de acordo com as instruções do fabricante utilizando o kit de purificação de produtos de PCR (PCR Purification Spin kit 50, Jetquick, Genomed).

PCR Purification Spin kit 50- Protocolo

1. Adição de 400 µL de solução H1 (solução de *binding* contém hidrocloreto de guanidina concentrado, EDTA, Tris/HCl e isopropanol) aos produtos de amplificação do 16S rDNA num microtubo para cada isolado. Nota: esta mistura foi incorporada nas colunas associadas a cada tubo colector.
 2. Centrifugação a 13.000 rpm por 1 minuto, descartou-se no final o líquido que se depositou no tubo colector.
 3. Adição de 500 µL da solução H2 (solução de lavagem contém etanol, NaCl, EDTA e Tris/HCl) em cada coluna.
 4. Duas centrifugações a 13.000 rpm por 1 min, sendo que no final das mesmas as colunas foram transferidas para novos microtubos.
 5. Adição de 30 µL de água destilada previamente aquecida até aos 65°C.
 6. Centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos
 7. As colunas foram descartadas e procedeu-se à devida identificação dos tubos segundo as normas da empresa de sequenciação referida anteriormente.
-

Os resultados das sequenciações foram visualizados e editados com o programa FinchTV (Geospiza). A identificação dos isolados foi efectuada por comparação com sequências do 16S rRNA em bases de dados, neste caso o servidor Eztaxon 2.1 acessível on-line em <http://www.eztaxon.org/> (Chun *et al.*, 2007).

10. Análise filogenética

As sequências de 16S rDNA foram alinhadas usando o programa ClustalX 2 (Larkin *et al.*, 2007) sendo adicionadas, para além das sequências dos 78 isolados seleccionados, sequências das estirpes tipo das espécies *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* e *E. mundtii* depositadas na base de dados do GenBank. A partir deste alinhamento múltiplo das sequências de 16S rDNA foi construída uma árvore filogenética pelo método de neighbour-joining e utilizando a medida de correcção de

distâncias Kimura-2-parameter. A estirpe *Streptococcus pneumoniae* ATCC33400^T foi usada como outgroup.

11. Identificação fenotípica

Como uma identificação presuntiva dos isolados foram levadas em consideração as características das colónias nos meios referidos anteriormente e utilizados para o isolamento das bactérias, nomeadamente o meio Agar de Slanetz & Bartley, meio Agar de Azida Esculina Canamicina e meio TSA.

Adicionalmente foram efectuados testes bioquímicos sendo os mesmos seleccionados de modo a abranger apenas as espécies encontradas numa prévia sequenciação do 16S RNA (descrita anteriormente), nomeadamente *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. hirae* e *E. durans*.

Deste modo foi seleccionado o teste da acidificação de L-arabinose (ARA), positivo para *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*; o teste da acidificação do manitol (MAN) com resultados positivos para *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* e ainda o teste da α -Galactosidase (α -GAL) positivo para *E. gallinarum*, *E. hirae* e *E. casseliflavus*. Para o teste MAN os isolados foram inoculados em meio Agar Manitol Sal (BioMérieux, França) por 24 h a 37°C. Por sua vez a acidificação da arabinose foi testada através de incubação com meio basal OF (Merck, Alemanha) por 24 h a 37°C ao qual foi adicionado L-Arabinose (Sigma) numa concentração de 1%. A capacidade dos organismos em análise para utilizar a α -Galactosidase foi determinada através da adição de 90 μ L de preparação de X- α -Gal (a partir de uma solução stock a 4 mg/mL) (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- α -D-galactopyranoside) (Sigma) em cada placa com 20 ml de meio TSA previamente solidificado, seguindo-se a incubação por um período de 24h a 37°C.

Relativamente ao teste de pigmentação, a coloração amarela ou branca das colónias de *Enterococcus* foi avaliada a olho nu através de recolha de uma pequena quantidade de células em meio TSA, com o auxílio de um palito estéril. A alteração, ou não, de cada um dos meios de cultura (Agar Manitol Sal, basal OF e TSA) através da mudança de cor das colónias em crescimento constitui a forma de constatação de um resultado positivo ou negativo. Os resultados positivos e negativos dos testes bioquímicos são apresentados na tabela 1 e basearam-se em Manero e Blanch (1999).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Tabela 1 - Resultados positivos e negativos dos testes bioquímicos (MAN, ARA, α -Gal, Pigmentação) baseados em Manero e Blanch (1999) e correspondentes espécies de *Enterococcus*.

Testes bioquímicos	RESULTADOS			
	Negativo	Espécies	Positivo	Espécies
MAN	Sem alteração do meio	<i>E. durans</i> <i>E. hirae</i>	Colónias e o meio de cultura adquirem coloração amarela	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. gallinarum</i>
ARA	Sem alteração do meio	<i>E. durans</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. hirae</i>	Colónias e o meio de cultura adquirem coloração amarela	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. faecium</i> <i>E. gallinarum</i>
α-Gal	Sem alteração do meio	<i>E. durans</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium(d)</i>	Colónias e o meio de cultura adquirem coloração azul	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. hirae</i> <i>E. gallinarum</i>
Pigmentação	Colónias de cor branca	<i>E. durans</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i>	Colónias de cor amarela	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum(d)</i>

Legenda: (d) resultado poderá ser variável entre positivo e negativo.

Composição dos meios (em g/L) e recomendações para a preparação das soluções utilizadas nos testes bioquímicos:

Meio Agar Manitol Sal

Peptona bacteriológica P 5,0

Extracto de levedura 2,0

Hidrolisado enzimático de caseína 4,0

Peptona bacteriológica 4,0

Extracto nutritivo 1,0

Manitol 10,0

Cloreto de sódio 70,0

Vermelho de fenol 0,0083

Agar-agar 15,0 (pH final 7,4 ± 0,2)

Meio OF basal

Caseína Enzimática Hidrolisada 2,00

Cloreto de Sódio 5,00

Fosfato de Dipotássio 0,30

Azul de Bromotimol 0,08

Agar-agar 2,00 (pH final 6,8±0,2)

Preparação da solução stock de L-Arabinose

Para o teste da L-Arabinose foi inicialmente preparada uma solução stock de L-Arabinose a 10%, sendo que foi adicionado ao meio basal OF o volume necessário para que estivesse presente no meio em concentração de 1%. Nota: Armazenar a solução stock à temperatura ambiente.

Preparação da solução stock de X-Gal

Para o teste da α -Gal foi preparada uma solução stock de X-Gal a 4 mg/ml em DMF (N,N-dimetilformamida). Nota: Armazenamento da solução stock a -20 °C num tubo protegido da luz.

12. Testes de susceptibilidade a antibióticos

Os padrões de susceptibilidade a antibióticos foram determinados pelo método de difusão em agar com discos, de acordo com as normas de CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2010). Inicialmente foi feita uma suspensão bacteriana, em tubos contendo NaCl a 0.9%, com densidade óptica de 0,5 MacFarland, sendo depois semeado em meio de cultura Agar de Mueller-Hinton (Merk, Alemanha). Posteriormente, foram colocadas na superfície do meio de cultura os discos com as concentrações determinadas de acordo com as normas citadas anteriormente. Os isolados de *Enterococcus* spp. foram testados quanto à susceptibilidade de 15 agentes antimicrobianos, pertencentes a 12 classes distintas (tabela 2), nas seguintes quantidades: penicilina 10U (P10), vancomicina 30µg (VA30), teicoplanina 30µg (TEC30), eritromicina 5µg (E5), tetraciclina 30µg (TE30), doxiciclina 30µg (DO30), ciprofloxacina 5µg (CIP5), nitrofurantoina 300µg (F300), rifampicina 15µg (RD15), fosfomicina 200µg (FOT200), cloranfenicol 30µg (C30), quinupristina/dalfopristina 15µg (QD15), linezolida 30µg (LZD30), gentamicina 120µg (CN120) e estreptomicina 300µg (S300) (Oxoid). As placas foram incubadas durante um período de 24h a 37°C no fim do qual se procedeu à medição dos diâmetros dos halos de inibição, formados em volta dos discos. De acordo com os resultados obtidos e os critérios recomendados por CLSI (2010) as estirpes foram classificadas como susceptíveis (S), com resistência intermédia (I) ou resistentes (R).

As estirpes *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foram utilizadas como estirpes controlo.

Composição em (g/L) do meio utilizado para os testes de susceptibilidade a antibióticos:

Meio Agar de Mueller-Hinton

Infusão de carne 20.0

Hidrolisado de caseína 17,5

Amido 1,5

Agar-agar 10,0 (pH final 7,2±0,2)

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Tabela 2 - Antibióticos utilizados para o método de difusão em agar de discos e respectiva classe.

Classe	Antibiótico(s)
Beta-lactâmicos	Penicilina
Aminoglicosídeos	Estreptomicina Gentamicina
Macrolídeos	Eritromicina
Tetraciclina	Doxicilina Tetraciclina
Quinolonas	Ciprofloxacinas
Glicopéptidos	Vancomicina Teicoplanina
Oxazolidinonas	Linezolida
Nitrofurantoína	Nitrofurantoína
Ansamicinas	Rifampicina
Fosfomicinas	Fosfomicina
Fenicóis	Cloranfenicol
Estreptograminas	Quinopristina/dalfopristina

RESULTADOS

1. Identificação fenotípica e genotípica de *Enterococcus* spp. presentes nas amostras de berbigão

1.1 Recolhas das amostras de *Enterococcus* spp.

Um total de 200 isolados foi obtido a partir de amostras de berbigão recolhidas de 15 locais distintos da Ria de Aveiro. Na figura 1 é apresentado o mapa da ria de Aveiro com a marcação dos 15 locais de amostragem e na tabela 1 os tipos de contaminantes que foram detectados em cada local.

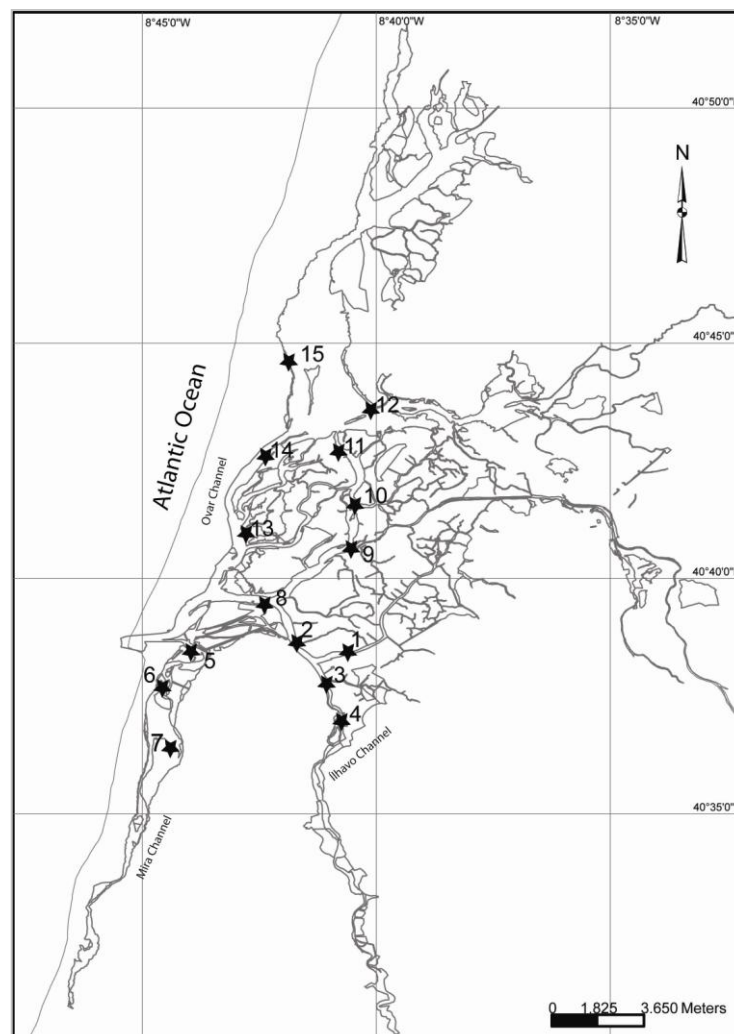


Figura 1- Mapa da Ria de Aveiro com os 15 locais de amostragem demarcados com o símbolo ★.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Tabela 3 - Tipos de contaminantes detectados nos locais de amostragem.

Locais de amostragem	Tipos de contaminantes
L6	HAPs
L7	BPCs
L5, L8, L10, L11, L12, L15	Hg
L1-L15	Al, Cr, Ni, Cu, Zn, Cd

1.2 Isolamento de *Enterococcus* spp.

O isolamento e identificação presuntiva do género *Enterococcus* tiveram em consideração as características de crescimento nos distintos meios de cultura. No meio Slanetz & Bartley detectou-se o crescimento de colónias com um dos 3 conjuntos de características observadas: (1) colónias de reduzidas dimensões e em grande abundância, coloração rosa muito escuro e possuidores de pequenos halos rosa claro; (2) colónia comparativamente de maiores dimensões, coloração rosa escuro com halos grandes e de cor rosa claro; (3) colónias de grandes dimensões, coloração rosa claro, com halos de grandes dimensões, reduzida abundância de colónias. Em meio Agar de Azida Esculina Canamicina verificou-se uma alteração da cor do meio de verde para negro devido à hidrólise da esculina, sendo esta uma característica distintiva do género *Enterococcus*. No meio TSA as colónias apresentaram uma coloração branca ou amarelada e de tamanho reduzido.

1.3 Identificação genotípica e análise da diversidade genética

A genotipagem dos 200 isolados foi realizada por ERIC-PCR, sendo apresentado na figura 2 um dos exemplos dos géis de agarose obtidos, onde é possível observar alguns dos perfis de bandas característicos deste grupo de bactérias.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

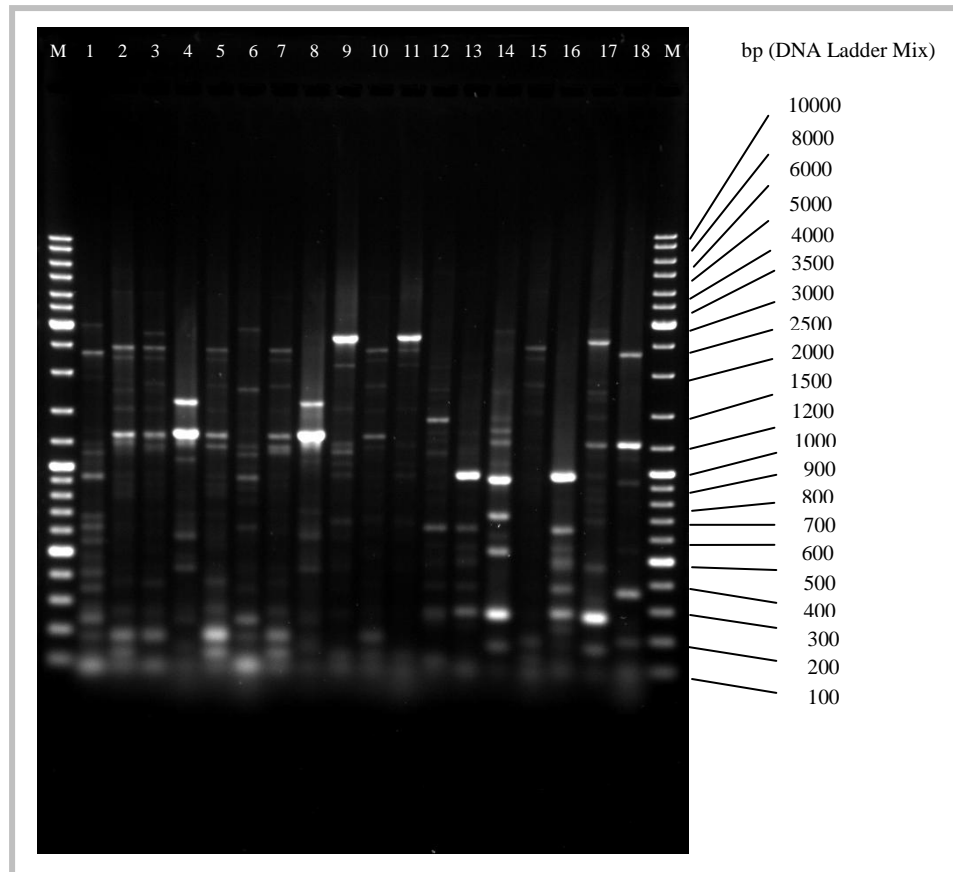


Figura 2- Imagem de um dos géis de agarose obtidos por electroforese dos produtos de ERIC-PCR.

Legenda: Carril 1 e 20 correspondem ao marcador de peso molecular utilizado (Gene Ruler DNA Ladder Mix) e os restantes carrils aos isolados: 50 (carril 2), 29 (carril 3), 61 (carril 4), 23 (carril 5), 64 (carril 6), 33 (carril 7), 4 (carril 8), 53 (carril 9), 57 (carril 10), 49 (carril 11), 42 (carril 12), 47 (carril 13), 39 (carril 14), 22 (carril 15), 34 (carril 16), 36 (carril 17), 35 (carril 18) e 55 (carril 19).

As imagens dos géis de agarose resultantes da genotipagem foram analisadas usando o software GelComparII (Applied Maths) sendo depois gerada uma matriz de similaridade de acordo com o coeficiente de Pearson, resultando na construção de um dendrograma segundo o método de UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), que pode ser visualizado na figura 3.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

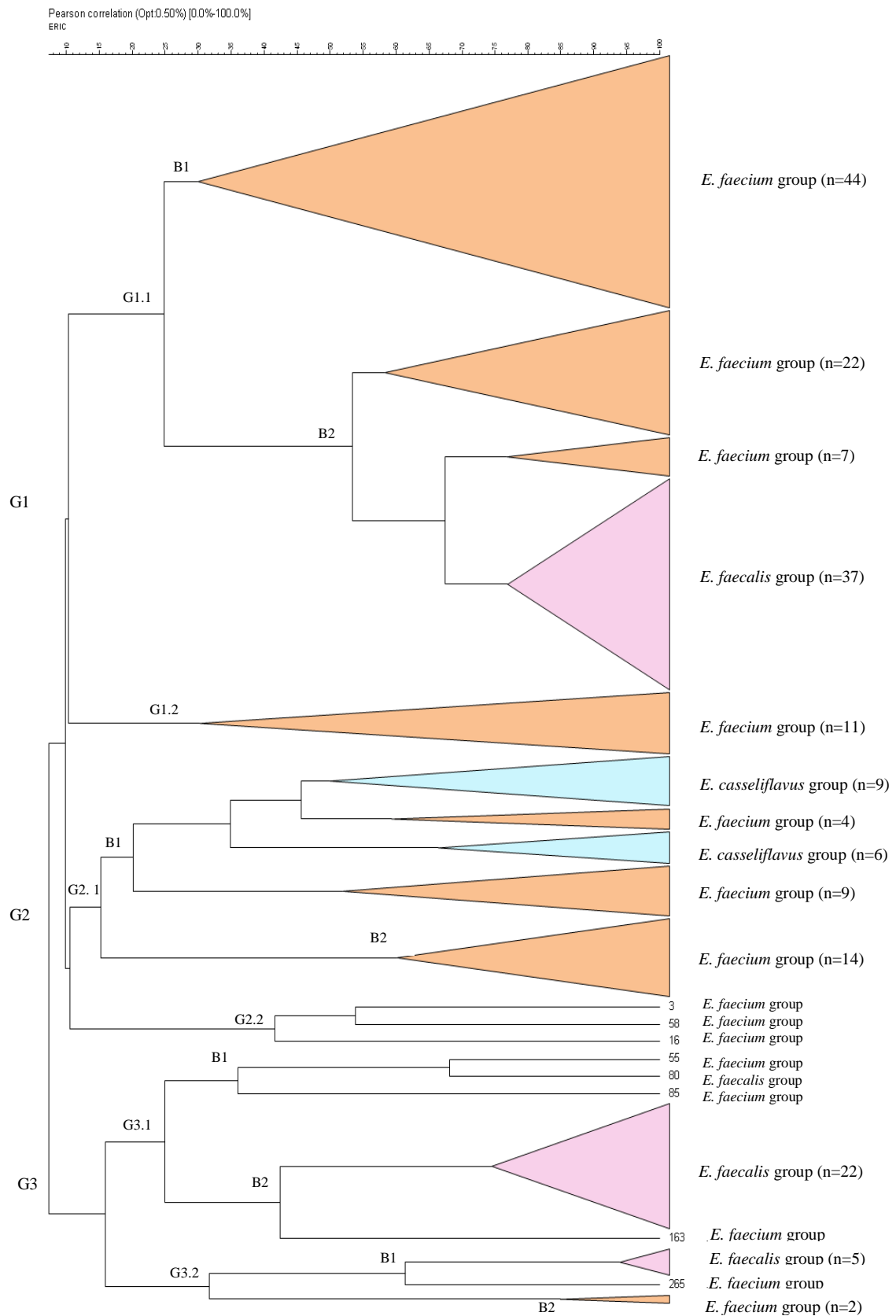


Figura 3 - Dendrograma construído de acordo com as identificações dos 200 isolados de *Enterococcus* sp., usando o coeficiente de correlação de Pearson e o método UPGMA para a formação dos grupos ou clusters.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

O dendrograma revela a formação de 3 grupos divergentes (G1, G2, e G3). Todos os grupos apresentam um coeficiente de similaridade bastante reduzido, o G1 e o G2 com aproximadamente 10% e o G3 com 15%.

O G1 é um grupo heterogéneo formado por 2 subgrupos divergentes, o G1.1 com um coeficiente de similaridade de cerca de 25% e divide-se em duas bifurcações, a B1 com um coeficiente de 30% que inclui apenas elementos do grupo de espécies *E. faecium* (n=44), enquanto a B2 com um coeficiente de aproximadamente 65% divide-se ainda em dois subgrupos. Um dos subgrupos engloba 22 elementos do grupo *E. faecium* e o restante ainda 7 elementos do grupo *E. faecium* (n=7) e 37 elementos do grupo *E. faecalis*. O grupo G1.2, com coeficiente de 30%, inclui apenas elementos do grupo *E. faecium* (n=11).

Por sua vez, o grupo G2 divide-se em dois subgrupos G2.1 com coeficiente de 15% e o G2.2 com um coeficiente de 40%. Cada um dos subgrupos divide-se ainda em duas bifurcações. Quanto ao subgrupo G2.1 a primeira bifurcação constitui um grupo bastante heterogéneo, com um coeficiente de 20% incluindo dois grupos de *E. casseliflavus* (n=9, n=6) intercalados com dois grupos de *E. faecium* (n=4, n=9). Enquanto a bifurcação B2 do G2.1 engloba apenas um único grupo de *E. faecium* com 14 elementos e apresenta um coeficiente de correlação consideravelmente elevada (60%). Do subgrupo G2.2 fazem parte 3 isolados, provavelmente todos pertencentes ao grupo *E. faecium*.

Quanto ao grupo G3 este divide-se em dois subgrupos ambos heterogéneos com um coeficiente de correlação de 25% para o G3.1 e 30% para o G3.2. O subgrupo G3.1 apresenta duas bifurcações, B1 que engloba 3 isolados dos quais dois pertencem ao grupo *E. faecium*, e um isolado ao grupo *E. faecalis*. Da B2 faz parte um grupo com 22 elementos de *E. faecalis* e um isolado do grupo *E. faecium*. Por sua vez o subgrupo G3.2 com um coeficiente de 30% engloba numa primeira bifurcação um grupo de 5 elementos de *E. faecalis* e um isolado do grupo *E. faecium*. A segunda bifurcação inclui apenas 2 elementos de *E. faecium*.

Globalmente e em relação ao grupo de espécies, os elementos do grupo *E. faecalis* distribuem-se apenas por 2 grupos distintos, dois de grande número de isolados (n=37 e n=22) e um com apenas 5 isolados, sendo que se verifica o aparecimento de um isolado (E80) distanciado dos restantes elementos de *E. faecalis*. Já os elementos do grupo *E. faecium* mostraram uma distribuição mais alargada e heterogénea, estando divididos em 8

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

grupos e ainda 4 isolados distanciados de todos os restantes representantes deste grupo de espécies. O grupo *E. casseliflavus* surge representado apenas por 2 grupos, um com 9 e outro com 6 elementos, ambos pertencentes à bifurcação B1 do grupo G2.1.

1.4 Sequenciação do gene 16S rDNA e análise filogenética

A sequenciação do gene 16S rDNA foi realizada para 78 isolados. Da pesquisa no servidor Eztaxon 2.1 com as sequências do 16S rDNA foram obtidas as identificações apresentadas na tabela 1.

Tabela 4 - Identificação dos isolados dos quais foi obtida sequência do 16S rDNA, com auxílio da ferramenta Eztaxon 2.1.

Identificação	Nº isolados
<i>E. faecalis</i>	23
<i>E. faecium/hirae/durans</i>	48
<i>E. casseliflavus/gallinarum</i>	7

Segundo a referida tabela é possível observar que surgiram algumas dificuldades em atingir o nível da espécie nos casos em que foi obtida a mesma percentagem de similaridade para as espécies *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans*, sendo que o mesmo se sucedeu para as espécies *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*. Recorreu-se aos testes bioquímicos para tentar solucionar estas dúvidas quanto à identificação dos isolados, no entanto tal como será referido posteriormente estes testes apresentaram resultados variáveis.

Numa análise filogenética, as sequências de 16S rDNA foram alinhadas usando o programa ClustalX sendo adicionadas, para além das sequências dos 78 isolados seleccionados, outras estirpes relacionadas presentes em bases de dados do GenBank (tabela 5). Assim, o alinhamento de múltiplas sequências de 16S rDNA permitiu a construção de uma árvore filogenética, revelando as relações filogenéticas entre os isolados de *Enterococcus* em análise.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Tabela 5 - Sequências de 16S rDNA de estirpes relacionadas às identificadas a partir das sequências dos 78 isolados seleccionados para sequenciação. Estas sequências foram retiradas da base de dados GenBank.

Estirpes	Nº acesso GenBank
<i>E. mundtii</i> ATCC43186 ^T	AF061013
<i>E. gallinarum</i> ATCC49573 ^T	AF039900
<i>E. durans</i> DSM20633 ^T	AJ276354
<i>E. hirae</i> ATCC8043 ^T	AF061011
<i>E. faecium</i> ATCC19434 ^T	DQ411813
<i>E. faecalis</i> V583	AE016830
<i>E. faecalis</i> ATCC19433 ^T	DQ411814
<i>E. casseliflavus</i> ATCC25788 ^T	AF039903
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC33400 ^T (1)	GU326244

Legenda: (1) A estirpe de *Streptococcus pneumoniae* foi usada como *outgroup* na análise.

A árvore filogenética baseada nas sequências 16S rDNA (figura 4) demonstra uma organização dos isolados em 3 grupos de espécies distintos: o primeiro corresponde ao grupo *E. faecium* (que inclui as espécies *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans*), seguindo-se o grupo *E. casseliflavus* (que engloba *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* que aparentemente são distinguíveis na árvore filogenética) e por fim um terceiro grupo formado por isolados de *E. faecalis*. A organização obtida permite ainda constatar a proximidade filogenética entre os grupos *E. faecium* e *E. casseliflavus*, em contraste *E. faecalis* apresenta-se com uma distância filogenética bem evidenciada das restantes.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

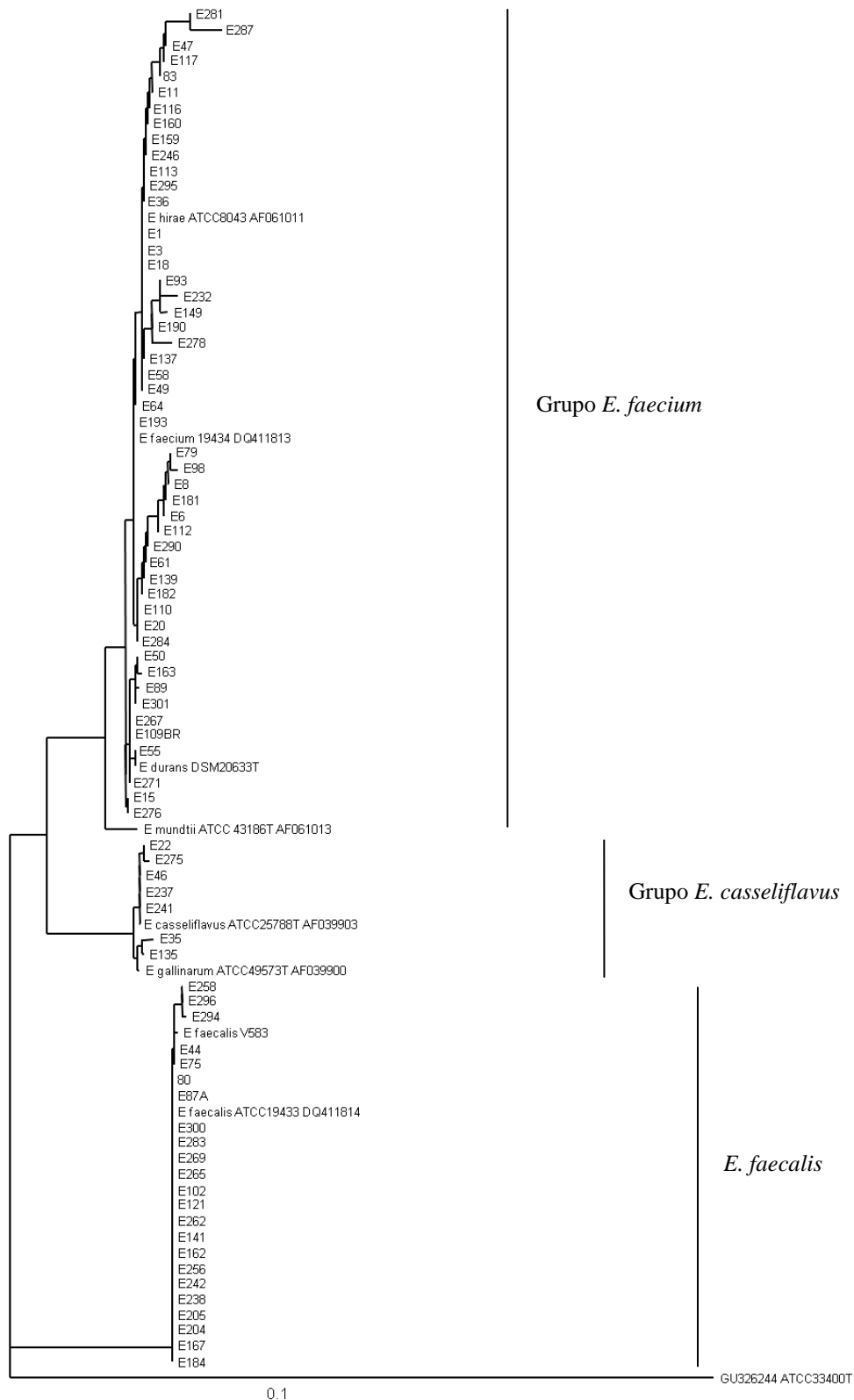


Figura 4 - Árvore filogenética baseada nas sequências 16S rDNA dos 78 isolados de *Enterococcus* spp. seleccionados e 8 sequências de 16S rDNA das estirpes tipo. A estirpe de *Streptococcus pneumoniae* foi usada como *outgroup* na análise.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

1.5 Testes bioquímicos

Os testes bioquímicos ARA, MAN e α -Gal foram seleccionados de forma a resolver dúvidas na identificação dos isolados que surgiram com o procedimento de sequenciação do 16S rDNA. Na figura 5 são apresentados os esquemas utilizados para identificação baseados em Bejuk (2000) e na tabela 6 os resultados dos testes esperados de acordo com Manero e Blanch (1999).

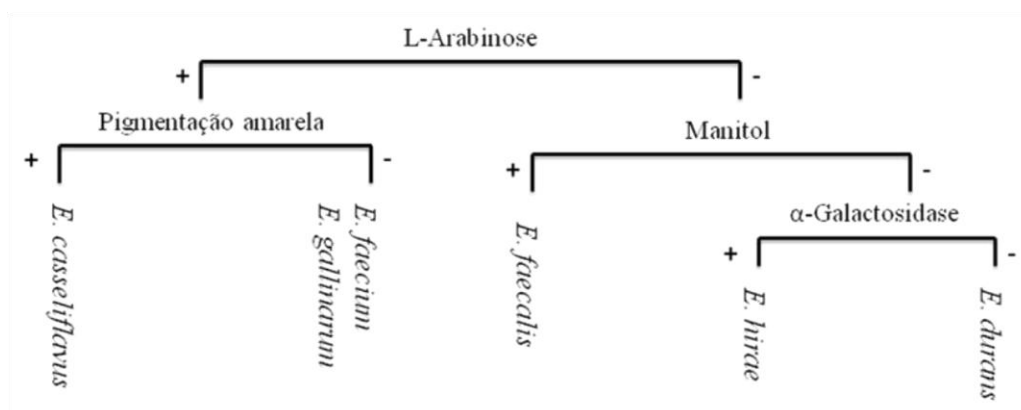


Figura 5 - Esquemas de testes bioquímicos utilizados (L-arabinose, Pigmentação amarela, Manitol e α -Galactosidase) para identificação dos 200 isolados em análise. Baseados em Manero e Blanch (1999).

Tabela 6 - Resultados dos testes bioquímicos identificativos das espécies *E. casseliflavus*, *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* e *E. gallinarum*.

Testes bioquímicos	Espécies					
	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. gallinarum</i>
MAN	POS	NEG	POS	POS	NEG	POS
ARA	POS	NEG	NEG	POS	NEG	POS
PIG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
α -Gal	POS	NEG	NEG	NEG (d)	POS	POS

Legenda: (d)- resultados variáveis entre estirpes.

Considerando apenas os resultados dos testes bioquímicos para identificação dos 200 isolados, e como se pode visualizar na tabela 7, as espécies com maior representação foram *E. faecalis* e a menor corresponde a *E. durans*. No entanto é também perceptível que os

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

resultados dos testes bioquímicos não foram esclarecedores, não permitiram em alguns casos a distinção entre as espécies *E. gallinarum* e *E. hirae* e não foram suficientes para atingir o nível da espécie de 20 dos isolados.

Tabela 7 - Identificações quanto à espécie dos 200 isolados, apenas de acordo com os testes bioquímicos executados.

Identificação	Nº isolados
<i>E. faecalis</i>	61
<i>E. faecium</i>	47
<i>E. gallinarum/E.hirae</i>	37
<i>E. durans</i>	5
<i>E. hirae</i>	22
<i>E. casseliflavus</i>	7
<i>Enterococcus</i> sp.	20

Devido a estas dificuldades para a identificação dos 200 isolados foi em primeira linha levado em consideração o dendrograma obtido com os resultados da genotipagem e com os dados da sequenciação do 16S rDNA. Recorreu-se aos resultados dos testes bioquímicos apenas como auxílio para casos de maior dificuldade, uma vez que mostraram a possibilidade de resultados variáveis. A par destas divergências assumiu-se como mais coerente a identificação dos isolados de acordo com o grupo de espécies, nomeadamente Grupo *E. faecium*, que engloba *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans*, Grupo *E. faecalis*, que neste caso inclui apenas a espécie *E. faecalis* e o Grupo *E. casseliflavus*, que é constituído por *E. casseliflavus* e *E. gallinarum*.

1.6 Grupos de espécies de *Enterococcus* presentes nas amostras

Com o auxílio das sequenciações do 16S rDNA e do dendrograma procedeu-se à identificação dos 200 isolados de acordo com os grupos de espécies: grupo *E. faecalis*, grupo *E. faecium* e grupo *E. casseliflavus*, sendo as percentagens de cada um apresentadas na figura 5.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Dos 200 isolados em estudo o grupo *E. faecium* foi o grupo predominante (60%; n=120/200), seguindo-se o grupo *E. faecalis* (32,5%; n=65/200), e por fim o menos representativo foi o grupo *E. casseliflavus* (7,5%; n=15/200).

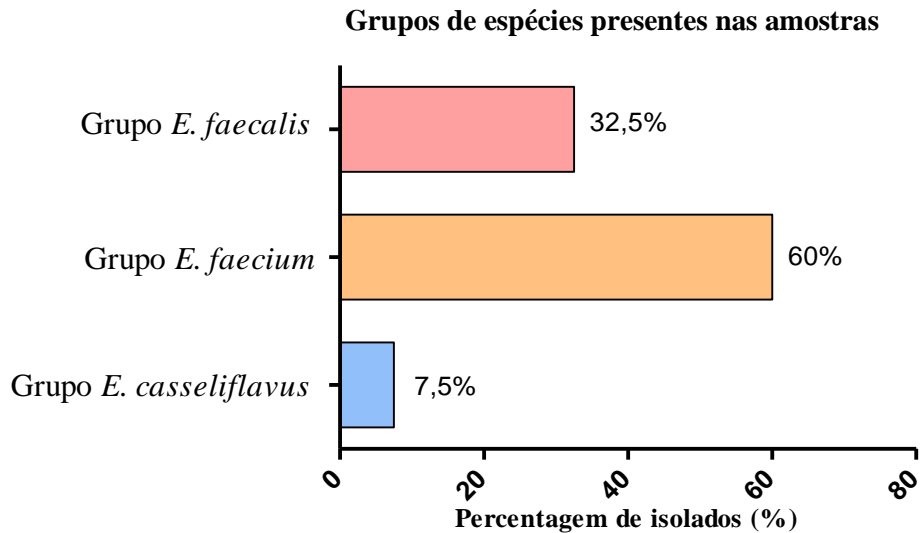


Figura 6 - Percentagem dos grupos de espécies *E. casseliflavus* (7,5%), *E. faecium* (60%) e *E. faecalis* (32,5%) presentes nos isolados em estudo.

1.7 Distribuição dos grupos de espécies pelos locais de amostragem

A distribuição dos grupos de espécies pelos locais de amostragem é apresentada na figura 7. Dos 15 locais de amostragem apenas não foram isolados quaisquer *Enterococcus* spp. das amostras de berbigões dos locais 3 e 15.

Quanto aos restantes 13 locais o grupo *E. faecium* foi detectado em todos. Por outro lado o grupo *E. faecalis* não teve representantes nos locais 2, 5, 6, 7, 9, 10 e 13, e o grupo *E. casseliflavus* nos locais 5, 6, 7, 9, 11 e 13.

Distribuição dos grupos de espécies pelos locais n=200

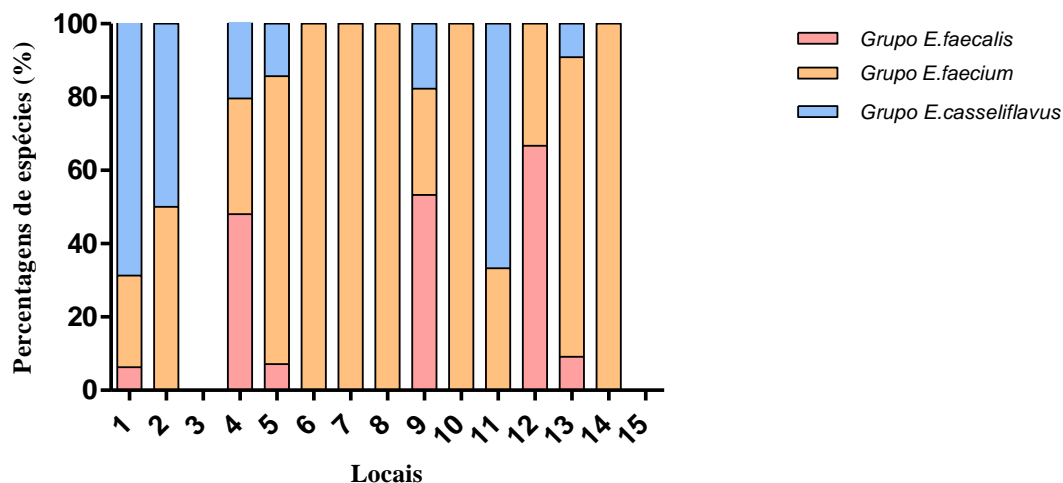


Figura 7 - Distribuição dos grupos de espécies de acordo com os 15 locais de amostragem. O grupo *E. faecalis* corresponde à cor magenta, o grupo *E. faecium* à cor laranja e o grupo *E. casseliflavus* à cor azul.

Especificamente para cada local, no local 1 o grupo *E. casseliflavus* foi o mais representativo com onze isolados, seguindo-se o grupo *E. faecium* com quatro e por último o grupo *E. faecalis* com apenas um isolado. No local 2 apenas foram encontrados dois isolados, um representante do grupo *E. faecium* e um outro pertencente ao grupo *E. casseliflavus*. Como referido anteriormente, no local 3 e 15 não foi isolada qualquer espécie do género *Enterococcus*.

O maior número de isolados foram originários do local 4 (n=79) e do local 9 (n=61), sendo que ambos demonstraram uma distribuição semelhante, na medida que o grupo *E. faecalis* foi o mais representativo (trinta e oito e trinta e três isolados no local 4 e 9 respectivamente), seguindo-se o grupo *E. faecium* (vinte cinco e dezoito isolados) e por ultimo o grupo *E. casseliflavus* (dezassete e onze isolados).

No local 5, representado por catorze isolados, o grupo *E. faecium* foi o predominante estando os restantes grupos em reduzido número, um isolado do grupo *E. faecalis* e dois do grupo *E. casseliflavus*. O grupo *E. faecium* foi o único presente nos locais 6, 7, 8 com apenas dois isolados em cada, e ainda nos locais 10 e 14 com apenas um isolado em cada um dos locais.

No local 11 dos três isolados encontrados apenas um pertence ao grupo *E. faecium* e dois ao grupo *E. casseliflavus*. Este último grupo não foi encontrado no local 12, onde dos

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

seis isolados quatro pertencem ao grupo *E. faecalis* e dois ao grupo *E. faecium*. No local 13 o grupo *E. faecium* foi o predominante com nove dos onze isolados totais e apenas um isolado representante de cada um dos restantes grupos *E. faecalis* e *E. casseliflavus*.

2. Avaliação da susceptibilidade a antibióticos

2.1 Resistências totais

Todos os 200 isolados demonstraram resistências ou resistências intermédias a pelo menos um dos antibióticos em estudo. De acordo com a figura 8 para os 200 isolados as percentagens de resistências e resistências intermédias mais baixas corresponderam aos aminoglicosídeos gentamicina (9,5%) e estreptomicina (21%), à fosfomicina (9%), à teicoplanina (20,5%) e ainda ao beta-lactâmico penicilina (24,5%). Por outro lado as maiores percentagens de resistência foram detectadas para o macrolido eritromicina (98%), linezolida (91,5%) da classe oxazolidinona e ciprofloxacina (87%). Quantos aos restantes antibióticos, 82% dos isolados mostraram resistência à quinopristina/dalfopristina, 81,5% à rifampicina, 71,5% à tetraciclina, 72% ao cloranfenicol, 66,5% à doxiciclina e 60% à nitrofurantoína.

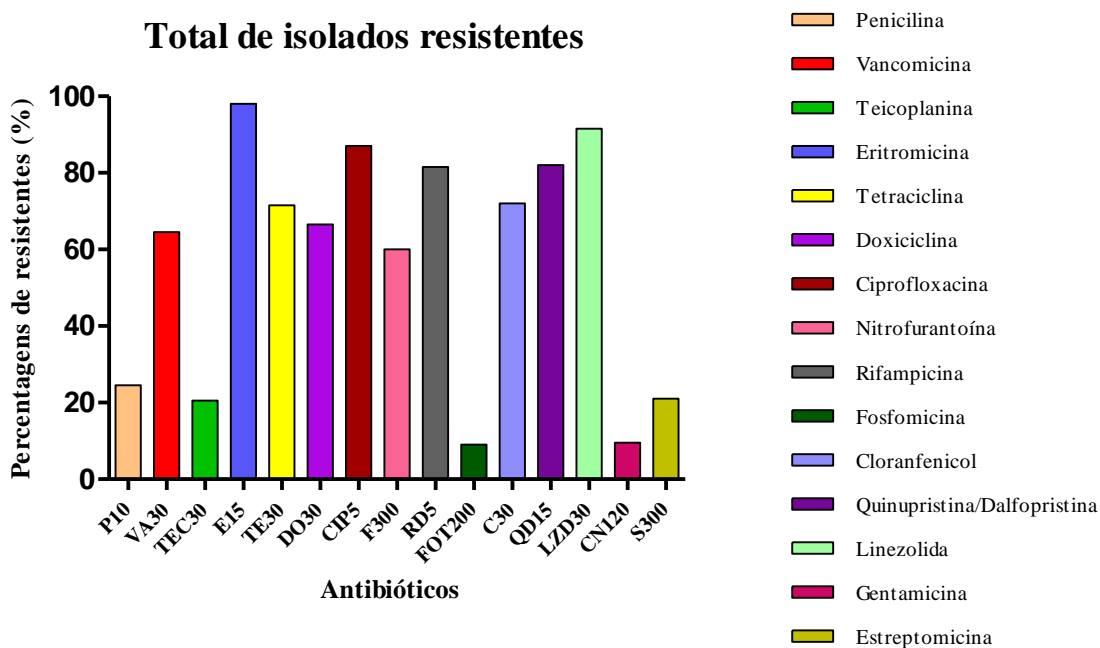


Figura 8 - Percentagens de resistências e resistências intermédias aos antibióticos em estudo para o total dos 200 isolados.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

De realçar ainda as elevadas percentagens de resistência das bactérias em estudo relativamente à vancomicina (64,5%), uma vez que os berbigões podem constituir um reservatório importante de isolados de *Enterococcus* resistentes a vancomicina, acrescentando-se a possibilidade de transferência de genes de resistência às bactérias do intestino humano através da cadeia alimentar.

Nas figuras 9, 10 e 11 são apresentadas as percentagens das resistências e resistências intermédias aos 15 antibióticos em estudo para cada espécie de *Enterococcus* individualmente. De uma forma geral, o grupo *E. faecium* apresenta percentagens de resistências mais elevadas comparativamente às restantes, mesmo que de uma forma pouco expressiva, e o grupo *E. casseliflavus* as menores.

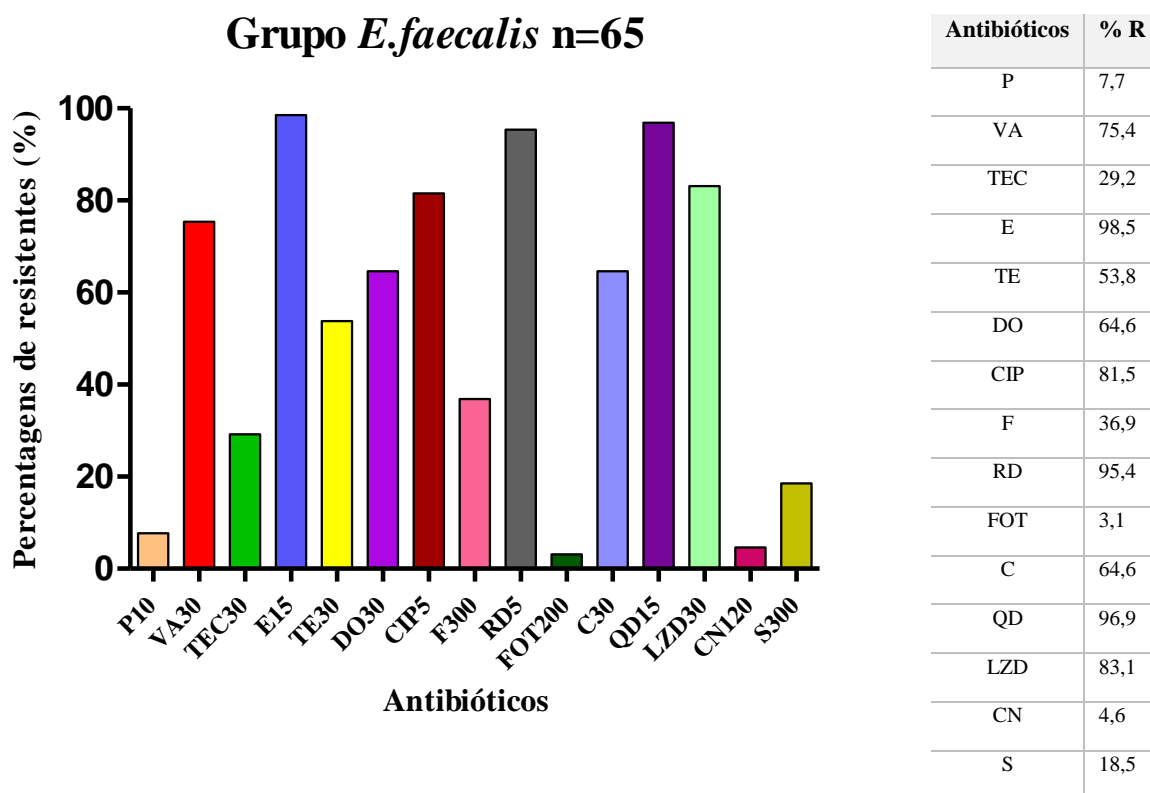


Figura 9 - a) Gráfico ilustrativo das percentagens de resistências para os 15 antibióticos avaliadas nos 65 elementos que constituem o grupo *E. faecalis*. b) Quadro auxiliar com os valores das percentagens de isolados resistentes (%R) para cada antibiótico.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Para os 65 isolados do grupo *E. faecalis* as maiores percentagens de isolados resistentes foram verificadas para a eritromicina (98,5%), quinopristina/dalfopristina (96,9%) e rifampicina (95,4%). De referir ainda a elevada resistência à vancomicina (75,4%) verificada nos isolados. Quanto às resistências de menor amplitude foram registadas para os antibióticos: penicilina (7,7%), fosfomicina (3,1%) e gentamicina (4,6%).

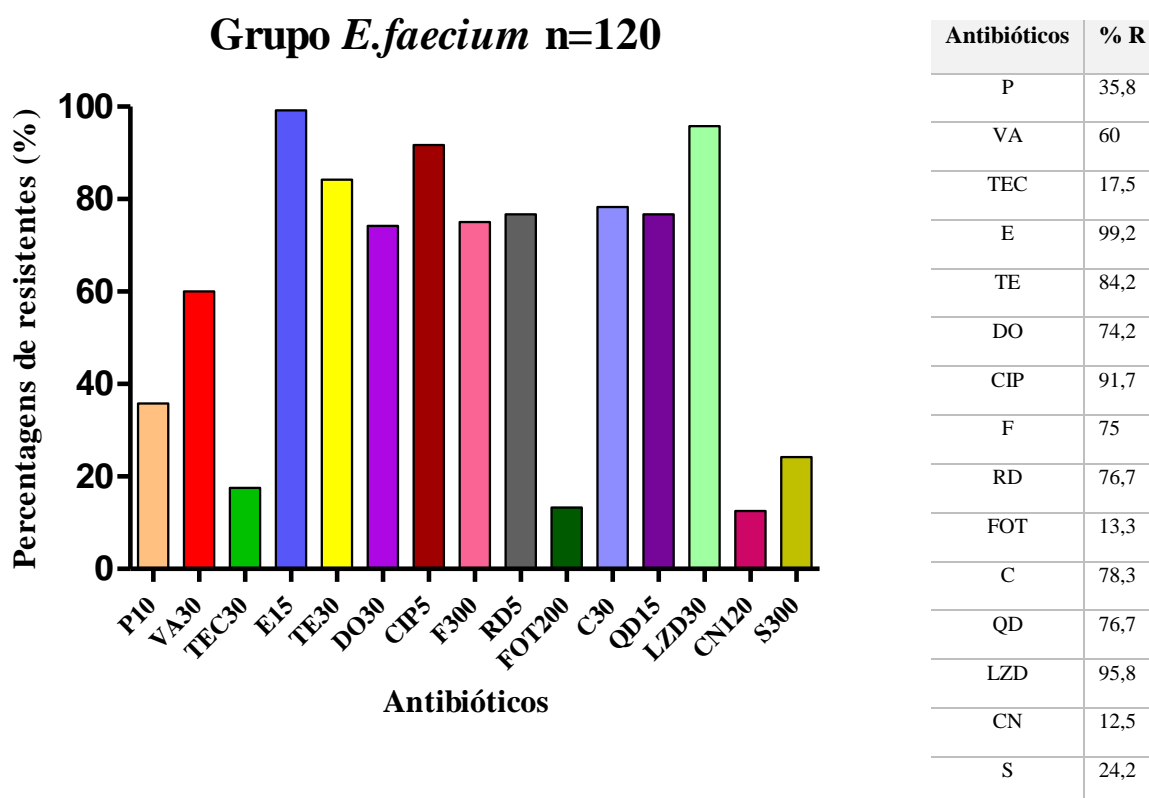


Figura 10 - a) Gráfico ilustrativo das percentagens de isolados resistentes para os 15 antibióticos, avaliadas nos 120 elementos que constituem o grupo *E. faecium*. 9 b) Quadro auxiliar com os valores das percentagens para cada antibiótico.

Os representantes do grupo *E. faecium* (n=120) mostraram as mais altas percentagens de resistência para eritromicina (99,2%), linezolida (95,8%) e ciprofloxacina (91,7%) sendo que as mais reduzidas resistências foram detectadas para fosfomicina (13,3%) gentamicina (12,5%) e teicoplanina (17,5%). De destacar ainda a elevada percentagem de resistência à vancomicina (60%).

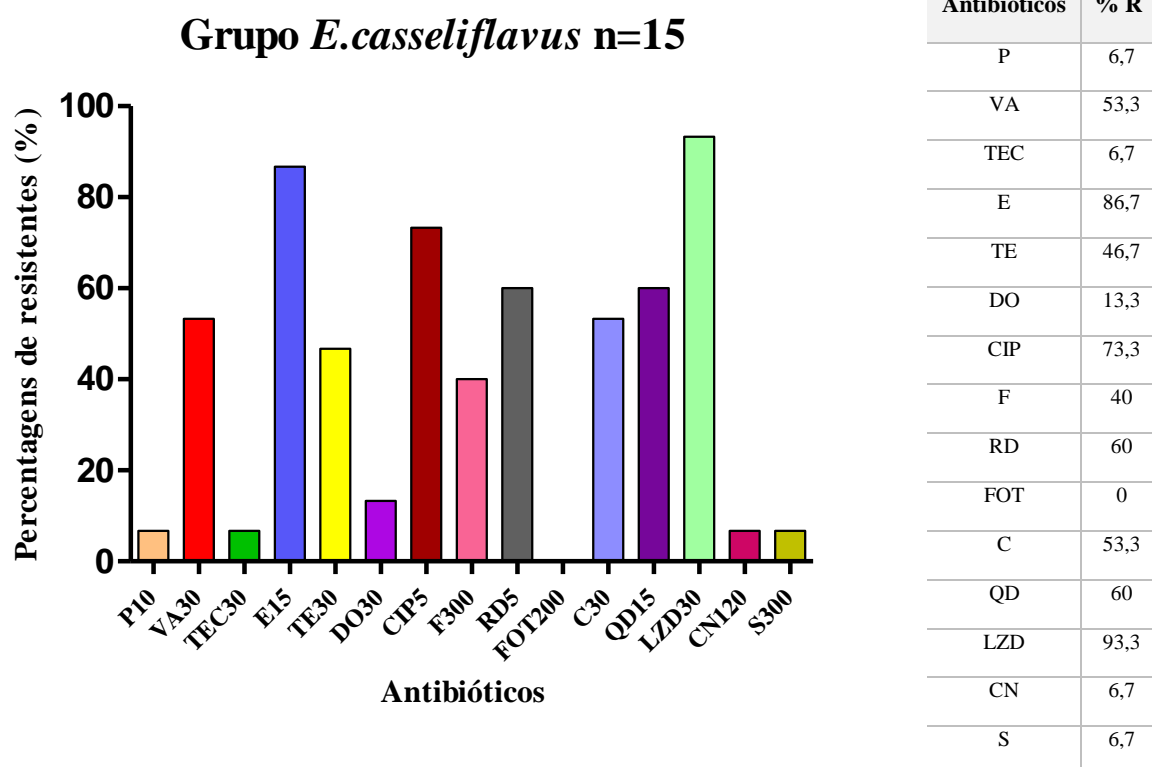


Figura 11 - a) Gráfico ilustrativo das percentagens de resistências para os 15 antibióticos avaliadas nos 15 elementos que constituem o grupo *E. casseliflavus*. b) Quadro auxiliar com os valores das percentagens para cada antibiótico.

As mais elevadas resistências no caso dos elementos do grupo *E. casseliflavus* (n=15) foram detectas para linezolida (93,3%), eritromicina (86,7%) e ciprofloxacina (73,3%). Relativamente às percentagens de resistências mais baixas foram observadas para gentamicina (6,7%), estreptomicina (6,7%), penicilina (6,7%) e teicoplanina (6,7%). Neste estudo todos os isolados do grupo *E. casseliflavus* mostraram-se susceptíveis a fosfomicina. Relativamente à vancomicina, cerca de 53,3% dos isolados foram resistentes.

De um modo global e comparando os 3 grupos de espécies, o grupo *E. faecium* apresenta as maiores percentagens de isolados resistentes para a todos os antibióticos em análise, com excepção para vancomicina, teicoplanina, rifampicina e quinupristina/dalfopristina. As maiores percentagens de isolados resistentes referentes a estas excepções estão antes associadas a *E. faecalis*.

A percentagem de isolados resistentes à penicilina foi muito inferior nos grupos *E. faecalis* (7,7%) e *E. casseliflavus* (6,7%) comparativamente ao grupo *E. faecium* (35,8%).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Quanto à vancomicina as percentagens de resistência foram consideravelmente elevadas para os 3 grupos de espécies. Nomeadamente, 53,3% dos isolados do grupo *E. casseliflavus*, 60% dos isolados do Grupo *E. faecium* e 75,4% dos isolados do grupo *E. faecalis* mostraram resistência à vancomicina.

A percentagem de isolados resistentes à teicoplanina foi baixa para todos os grupos, *E. faecium* (17,5%) e *E. faecalis* (29,2%), e em especial no grupo *E. casseliflavus* (6,7%).

No grupo *E. faecalis* foi registada a maior percentagem de isolados não susceptíveis à rifampicina (95,4%), seguindo-se o grupo *E. faecium* (76,7%) e com a menor percentagem o grupo *E. casseliflavus* (60%).

A percentagem de resistência à quinopristina/dalfopristina foi extremamente elevada no grupo *E. faecalis* (96,9%), sendo igualmente alta nos grupos *E. faecium* (76,7%) e *E. casseliflavus* (60%). Relativamente ao antibiótico eritromicina nos três grupos de espécies entre 86 e 99% dos isolados mostraram resistência.

Na avaliação da susceptibilidade à tetraciclina foi verificada uma percentagem muito elevada de isolados resistentes (84,2%) para o grupo *E. faecium*, comparativamente aos restantes grupos onde cerca de 50% dos isolados não foram susceptíveis.

Nos grupos *E. faecalis* e *E. faecium* aproximadamente 60 e 70% dos isolados, respectivamente, foram resistentes à doxiclina, contrastando com os apenas 13% dos isolados do grupo *E. casseliflavus*.

Em todos os grupos foi verificada uma elevada percentagem de isolados resistentes à ciprofloxacina, desde 73,3% no grupo *E. casseliflavus* até 91,7% no grupo *E. faecium*, passando por 81,5% no grupo *E. faecalis*. Em contrapartida, relativamente à nitrofurantoína as percentagens de isolados resistentes foram consideravelmente distintas de grupo de espécie para grupo de espécies, nomeadamente 75% de isolados do grupo *E. faecium*, 36,9% do grupo *E. faecalis* e 40% do grupo *E. casseliflavus*.

Quanto ao cloranfenicol foram registadas elevadas percentagens de isolados resistentes nos 3 grupos, desde 53,3% em *E. casseliflavus*, 64,6% em *E. faecalis* até 78,3% em *E. faecium*. A percentagem de isolados resistentes ao linezolida foi das mais elevadas, com um mínimo verificado para o grupo *E. faecalis* (83,1%) até aos 95,8% em *E. faecium*.

De destacar as diferenças de percentagens de isolados resistentes à fosfomicina, na medida que os elementos do grupo *E. faecium* mostraram uma percentagem de 13,3%

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

enquanto no grupo *E. faecalis* apenas 3% dos isolados demonstraram resistência, sendo que no grupo *E. casseliflavus* nenhum dos isolados foi resistente a este antibiótico.

Importa ainda realçar que no caso dos antibióticos gentamicina e estreptomicina, apesar de serem registadas percentagens baixas para os 3 grupos, foram consideravelmente mais elevadas para o grupo *E. faecium* (12,5% e 24,2% respectivamente).

2.2 Distribuição das resistências pelos locais de amostragem

O local 4 e 9 evidenciaram-se dos restantes grupos de amostragem relativamente ao número de isolados correspondentes. Assim apenas foi possível inferir acerca das percentagens de isolados resistentes aos 15 antibióticos em análise nestes dois locais.

Deste modo na figura 12 e 13 são apresentadas as percentagens de isolados resistentes para os locais de amostragem 4 e 9, respectivamente. Na tabela 8 são apresentadas as percentagens correspondentes para todos os locais.

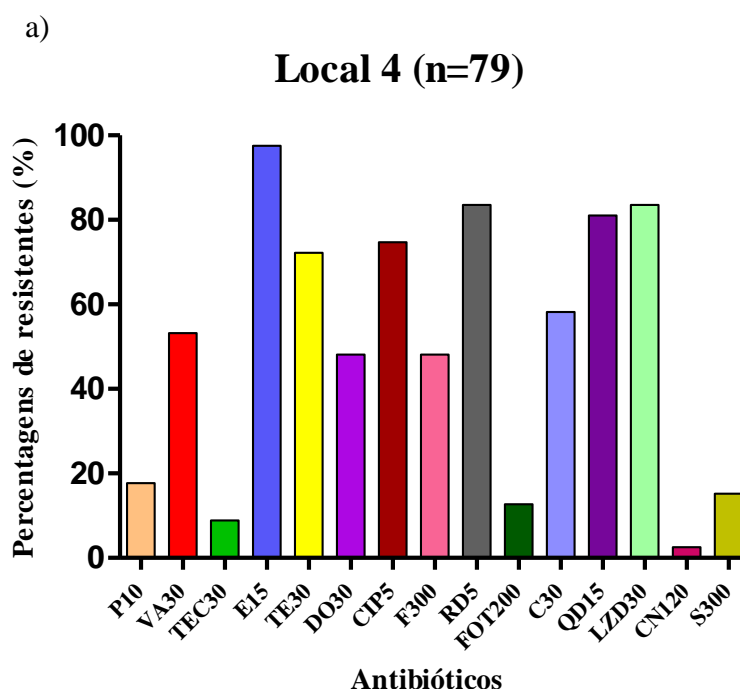


Figura 12 - Percentagens de isolados resistentes para os 15 antibióticos em análise, correspondentes aos isolados do local de amostragem 4 (n=79).

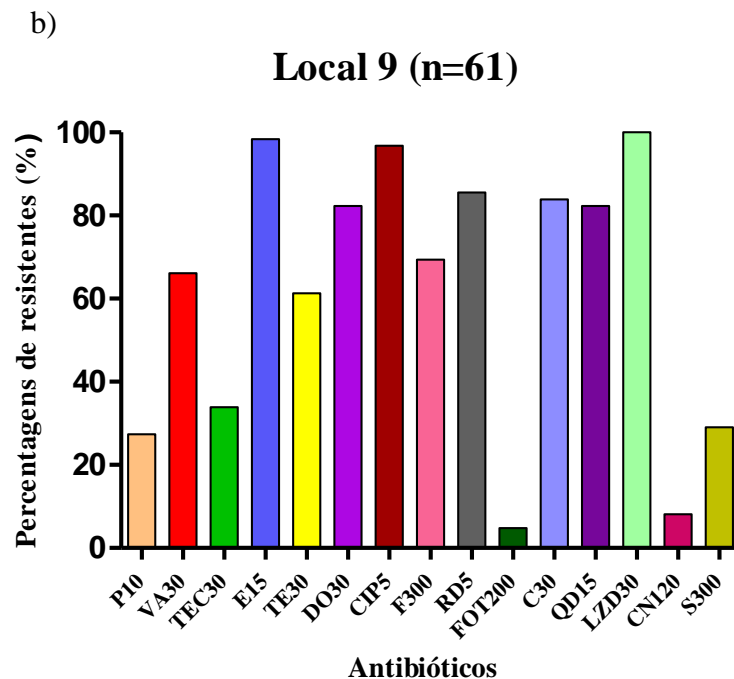


Figura 13 - Percentagens de isolados resistentes para os 15 antibióticos em análise, correspondentes aos isolados do local de amostragem 9.

Comparando as percentagens de isolados resistentes para o local 4 (n=79) e o local 9 (n=61), de um modo geral este ultimo está associado a percentagens de resistência mais elevadas para cada um dos antibióticos, com excepção para tetraciclina e fosfomicina. Quanto à tetraciclina no local 4 e 9 foram registados cerca de 72,2% e 60,7% de isolados resistentes a este antibiótico, respectivamente. Relativamente à fosfomicina, o local 9 apenas englobou 4,9% de isolados resistentes, contrastando com os 12,7% de resistentes do local 4.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

Tabela 8 - Para cada um dos 15 locais de amostragem foram registadas as percentagens de isolados resistentes a cada antibiótico em estudo.

Locais	Percentagens de Resistentes (%)														
	P	VA	TEC	E	TE	DO	CIP	F	RD	FOT	C	QD	LZD	CN	S
L1 n=16	31,3	56,3	12,5	100	62,5	56,3	87,5	50	56,3	12,5	56,3	87,5	93,8	6,3	37,5
L 2 n=2	50	100	0	100	50	50	100	100	50	0	50	0	100	50	0
L 4 n=79	17,7	53,2	8,9	97,5	72,2	48,1	74,7	48,1	83,5	12,7	58,2	81	83,5	2,5	15,2
L 5 n=14	42,9	85,7	28,6	100	92,9	85,7	100	71,4	71,4	21,4	92,9	64,3	85,7	28,6	28,6
L 6 n=2	50	50	0	100	100	50	100	100	100	0	100	100	100	0	0
L 7 n=2	50	50	0	100	100	50	100	100	50	0	50	100	100	0	0
L 8 n=2	50	50	0	100	100	100	100	50	100	0	50	100	100	0	0
L 9 n=61	26,2	67,2	34,4	98,4	60,7	83,6	96,7	68,9	85,2	4,9	85,2	82	100	8,2	29,5
L 10 n=1	0	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	0	0
L 11 n=3	33,3	66,6	33,3	100	66,6	66,6	66,6	100	100	0	66,6	100	100	0	0
L 12 n=6	0	100	33,3	100	66,6	66,6	100	50	83,3	0	83,3	100	100	0	0
L 13 n=11	27,3	72,7	27,3	100	81,8	90,9	81,8	54,5	90,9	9,1	72,7	81,8	90,9	18,2	9,1
L 14 n=1	0	100	0	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0

2.3 *Enterococcus* multirresistentes

Considerando que o conceito de microrganismo multirresistente corresponde a resistência a pelo menos 3 classes distintas de antibióticos, da totalidade dos 200 isolados 99,5% (n=199/200) correspondem a *Enterococcus* multirresistentes. Todos os isolados foram resistentes a pelo menos uma classe de antibióticos. No entanto apenas 2 isolados mostraram resistência às 12 classes em análise, mas não à totalidade dos 15 antibióticos.

DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como principal objectivo a caracterização de espécies de *Enterococcus* presentes em amostras de berbigão obtidas da Ria de Aveiro. Esta análise passou primariamente pela identificação das espécies isoladas destas amostras e numa fase posterior pela avaliação da susceptibilidade a antibióticos. Nos 3 grupos de espécies identificados Grupo *E. faecalis*, Grupo *E. faecium* e Grupo *E. casseliflavus* foram de forma geral observadas elevadas percentagens de isolados resistentes aos antibióticos testados, tratando-se quase a totalidade dos isolados de organismos multirresistentes.

Através dos procedimentos de isolamento e identificação foi possível inferir a contaminação das amostras de berbigão por *Enterococcus*, sendo isoladas na totalidade 200 estirpes de *Enterococcus* spp. A contaminação destes moluscos marinhos por agentes patogénicos, nos quais se insere *Enterococcus*, está associada a perigos para a saúde humana, na medida que os procedimentos tradicionais de preparação do berbigão como fonte de alimentação tornam possível que constituam importantes vectores de doenças transmitidas por alimentos. Nomeadamente, os bivalves são processados de forma mínima, sendo que tradicionalmente são consumidos crus ou apenas ligeiramente cozinhados (Lees, 2000).

De um modo geral os vírus e bactérias são os agentes causadores de doenças mais citados, associados ao consumo de bivalves (Oliveira *et al.*, 2011). Os vírus são frequentemente a causa de infecções causadas por alimentos, mas as hospitalizações e as mortes estão especialmente associadas a bactérias (Butt *et al.*, 2004).

No que refere às bactérias os agentes biológicos mais frequentemente associados a doenças causadas por bivalves e que são alvo de análise, pelos procedimentos de investigação da qualidade destes organismos, incluem *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *E. coli* enterotoxigénica, *Campylobacter jejuni*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio vulnificus*, *V. parahaemolyticus* e *V. cholerae* (Oliveira *et al.*, 2011), não sendo portanto comum a relevância de *Enterococcus*. No entanto, o elevado número de *Enterococcus* multirresistentes a antibióticos isolados de berbigão neste estudo pode constituir um facto importante, sendo que por esse mesmo motivo estes patogénicos deveriam também ser levados em consideração no que se refere aos agentes biológicos a

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

serem investigados para inferir a contaminação de bivalves. Uma vez que enterococos constituem microrganismos com impacto na saúde humana, encontrando-se actualmente entre os mais preocupantes patogénicos nosocomiais, sendo responsáveis por uma grande diversidade de infecções (Valenzuela *et al.*, 2010).

A contaminação destes organismos por elevadas taxas de *Enterococcus* multirresistentes poderá ser uma consequência da contaminação das águas nas quais se desenvolvem na Ria de Aveiro, sendo que é reconhecido que a segurança microbiológica dos bivalves está directamente relacionada com a água na qual crescem. Lees (2000) acrescenta ainda que o aumento da densidade populacional acaba por aumentar igualmente a vulnerabilidade das áreas de crescimento dos bivalves, expondo-os a contaminantes de origem humana e industrial (Lees, 2000). As fontes de contaminação fecal humana e animal incluem resíduos de animais, chuvas intensas e fluxos de rios. Descargas não controladas de esgotos, escoamentos de contaminantes derivados de actividades agrícolas podem produzir por sua vez contaminação esporádica (Oliveira *et al.*, 2011).

Desta forma, os bivalves podem estar a ser expostos a resíduos de antibióticos e a patogénicos multirresistentes como um dos resultados do uso de antibióticos na medicina humana e veterinária. Estes patogénicos multirresistentes podem também reentrar na cadeia alimentar (Lees, 2000).

Relativamente à identificação das espécies de *Enterococcus* presentes nas amostras, neste estudo tanto a identificação bioquímica como a genotipagem possibilitou a distinção entre *E. faecalis* das restantes espécies de *Enterococcus*. O mesmo não aconteceu relativamente a *E. faecium*, onde as identificações pelos testes bioquímicos vs. identificação genética entraram frequentemente em conflito. A sequenciação do 16S rDNA e posterior construção de uma árvore filogenética foi usada para resolver estas discrepâncias, no entanto a elevada similaridade genética entre *E. faecium*, *E. durans* e *E. hirae* não permitiu a distinção entre estes elementos do grupo *E. faecium*. Este baixo poder discriminatório que as sequências de 16S rDNA possuem para várias espécies de *Enterococcus*, nomeadamente para as espécies do grupo *E. faecium*, foi igualmente constatado em estudos anteriores (Naser *et al.*, 2005).

Em relação às espécies de *E. casseliflavus* e *E. gallinarum* que aparentemente se distinguem na árvore filogenética obtida (figura 4), os valores de similaridade de 99,7 a

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

99,9 % para as sequências de 16S rDNA entre estas espécies revelados em estudos anteriores (Goh *et al.*, 2000; Naser *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 1998; Poyart; 2000), torna mais coerente o seu agrupamento constituindo desta forma o grupo *E. casseliflavus*.

As próximas relações filogenéticas entre as referidas espécies contribuem para dificuldades na caracterização fenotípica e molecular, complicando o seu uso em estudos de microbiologia ambiental nos quais a identificação exacta e inequívoca das espécies é de elevada importância.

Tal como referido em Poyart (2000) a interpretação dos dados obtidos por sequenciação do 16S rDNA pode gerar dificuldades, nomeadamente na identificação intraespécie. Na tentativa de resolução destas questões estudos propõem a utilização de sequências alternativas que exibem uma maior divergência comparativamente a 16S rDNA, como exemplo o gene *sodA*, que codifica a superóxido dismutase dependente de magnésio pode assumir esses critérios (Poyart *et al.*, 2000; Baele, 2000) revelou igualmente a eficácia da aplicação de espaço intergénico tRNA na identificação de *Enterococcus*, a par da utilização do gene *ddl* (Angeletti *et al.*, 2001).

Pelo contraste, *E. faecalis* representa uma linhagem distinta dentro de *Enterococcus* sendo que as grandes distâncias filogenéticas entre *E. faecalis* e outras espécies de *Enterococcus* constituem uma vantagem, permitindo uma rápida caracterização destes isolados. Deste modo procedeu-se à identificação dos isolados de acordo com os grupos de espécies: grupo *E. faecalis*, grupo *E. faecium* e grupo *E. casseliflavus*.

A correcta identificação de *Enterococcus* spp. é de elevada importância, sendo que uma das maiores incertezas e dificuldades na investigação de microbiologia ambiental reside na correcta e precisa identificação de espécies bacterianas. Na medida que sem uma identificação exacta dos organismos alvo são logo comprometidos desde o início os estudos em áreas importantes tais como epidemiologia, avaliação da susceptibilidade a antibióticos e a monitorização de fontes ambientais (Harwood *et al.*, 2004).

O procedimento de genotipagem possibilitou a construção de um dendrograma obtido segundo o método UPGMA com base no coeficiente de Pearson, o qual mostrou a formação de 3 grupos bastante heterogéneos. Os elementos do grupo *E. faecium* distribuíram-se nos 3 grupos G1, G2 e G3, enquanto *E. faecalis* distribuiu-se apenas em dois grupo G2 e G3 e *E. casseliflavus* apenas num único grupo (G2). A distribuição por 8 subgrupos do grupo *E. faecium* poderá estar associada ao facto deste grupo incluir as

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

espécies *E. faecium*, *E. hirae* e *E. durans*. Ou ainda indiciar diferentes origens, ou seja, estirpes recolhidas de diferentes locais de amostragem. Contrastando com o grupo *E. faecalis* que apresenta uma distribuição em apenas 3 subgrupos.

Dos grupos de espécies identificados 60% dos isolados corresponderam ao grupo *E. faecium*. Tendo em consideração que este grupo de espécies adquire com maior facilidade resistências a antibióticos não é de estranhar a sua predominância (Devriese *et al.*, 2006). O grupo *E. faecalis* foi igualmente bem representado com 32,5% dos isolados. Por outro lado o grupo *E. casseliflavus* foi o menos representativo (7,5%), justificado pela sua associação frequente a plantas e não a animais e ambientes aquáticos. De facto é reconhecido que apesar de *E. faecalis* ser a espécie de *Enterococcus* mais frequente em infecções nosocomiais, *E. faecium* possui uma maior capacidade para adquirir resistências a antibióticos (Araújo *et al.*, 2010). As espécies *E. faecalis* e *E. faecium* são ainda consideradas como mais específicas para humanos, comparativamente a outras espécies de *Enterococcus*, e considera-se que sobrevivem durante períodos mais longos em ambientes aquáticos (Arvanitidou *et al.*, 2001). Tais afirmações permitem explicar a predominância, neste estudo em concreto, do grupo de espécies *E. faecalis* e *E. faecium* comparativamente a *E. casseliflavus*.

A distribuição dos grupos de espécies foi distinta de local para local de amostragem. Os locais 4 e 9 evidenciaram maior abundância de isolados e por conseguinte maior número de *Enterococos* multirresistentes a antibióticos. Em ambos os locais foi detectada contaminação por metais, nomeadamente Al, Cr, Ni, Cu, Zn e Cd. De facto, uma importante característica de *Enterococcus* é a sua resistência ao stress químico e físico, aos antibióticos e aos metais pesados, o que não acontece com outras bactérias fecais que são libertadas no ambiente (Kimiran-Erdem *et al.*, 2007).

Como um resultado do aumento da industrialização, a poluição aquática devido aos metais pesados pode constituir um problema sério em vários sistemas aquáticos, tal como a Ria de Aveiro, sendo que as bactérias conseguem adquirir resistência após a exposição a esses agentes.

Segundo Kimiran-Erdem (2007) a combinação de resistências a antibióticos e a metais pesados pode não ser um fenómeno meramente coincidente e a resistência a bactérias contra metais pesados parece estar directamente relacionada com a presença desses

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

elementos como poluentes ambientais. De acordo com Baker-Austin (2006) vários estudos sugerem que a contaminação por metais pesados em ambientes naturais pode ter um papel importante na manutenção e proliferação de resistências a antibióticos, sendo que esta associação revela o mecanismo reconhecido como co-selecção. Para além disso, ao contrário dos antibióticos, os metais não são sujeitos a degradação, podendo desta forma exercer uma pressão selectiva a longo termo (Stepanauskas *et al.* 2005).

Em contrapartida, nos locais contaminados com HAPs, BCPs e Hg, individualmente, foi isolado um número reduzido de enterococos, o que poderá evidenciar a baixa resistência de sobrevivência destes microrganismos a estes componentes. Como referido anteriormente, a maior abundância de isolados está associada ao local 4 e 9 sendo que em ambos os locais o grupo *E. faecalis* foi o mais representativo, seguindo-se o grupo *E. faecium* e por último o grupo *E. casseliflavus*. A predominância de *E. faecalis* nestes locais poderá estar associada a elevada contaminação fecal. De realçar que o local 4 situa-se no Canal de Ílhavo, correspondendo a águas salobras bastante afectadas por poluição provocada por aquaculturas, resíduos domésticos e escorrência de agriculturas. O que pode justificar o elevado número de *Enterococcus* detectados neste local. Apesar destas características como águas bastante poluídas, importa realçar que o referido local constitui uma zona de apanha bastante intensa de berbigão (Sobral, 2000). Por outro lado o local 9 situa-se no meio da Ria, não estando associado a actividades de aquaculturas, agriculturas nem à proximidade de descargas de esgotos domésticos ou industriais, no entanto situa-se relativamente próximo da foz do Rio Vouga. Segundo Rebelo (2007) o Rio Vouga transporta sedimentos que se depositam na sua foz, causando grandes níveis de poluição neste local, o que de um certo modo pode justificar a correspondente elevada abundância de *Enterococcus* verificada no presente estudo para o local 9.

Considerando a emergência do patogénico *Enterococcus*, a sua abundância em locais de intensa apanha de berbigões pode representar potenciais perigos para a saúde pública.

Neste estudo os isolados de *Enterococcus* foram ainda testados quanto à sua resistência a um conjunto de 15 antibióticos. Tal como em Novais (2005) os resultados do presente estudo demonstram que *E. faecium* e *E. faecalis* são as espécies com maiores percentagens de isolados resistentes a antibióticos. Levando ainda em consideração o

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

número superior de isolados destas espécies comparativamente a *E. casseliflavus*, pode acabar por justificar igualmente estas diferenças.

Enterococcus faecium apresenta valores mais elevados para penicilina, ciprofloxacina, teicoplanina, doxicilina, furantoína, fosfomicina, cloranfenicol, linezolida e aminoglicosídeos. Enquanto *E. faecalis* demonstrou ser menos susceptível aos glicopéptidos, rifampicina e quinopristina-dalfopristina.

Neste estudo cerca de 99% dos isolados constituem provavelmente organismos multirresistentes. Barreto (2009) refere que vários plasmídeos transportam vários genes de resistência, levando a bactérias multirresistentes capazes de suportar simultaneamente 3, 4 ou até mais classes de antibióticos.

Segundo Klare (2003) *Enterococcus*, especialmente *E. faecium* possui um amplo espectro de resistências naturais e adquiridas a antibióticos. *Enterococcus* apresenta resistências intrínsecas aos seguintes agentes: penicilinas semisintéticas (como oxacilina), aminoglicosídeos (baixo nível de resistência), vancomicina (baixo nível: *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*), lincosamidas, polimixinas, estreptogaminas (*E. faecalis*) e monolactâmicos.

Os grupos *E. casseliflavus* e *E. faecalis* mostraram uma susceptibilidade à penicilina muito próxima (6,7% e 7,7% respectivamente) e comparativamente muito inferior a *E. faecium* (35,8%). As taxas de resistência à penicilina são muito variáveis nos diferentes estudos analisados, sendo distintas igualmente dependendo se se tratam de isolados clínicos ou ambientais. De um modo geral os elementos do género *Enterococcus* apresentam uma reduzida resistência intrínseca a beta-lactâmicos. Ainda assim, e relativamente às espécies, *E. faecalis* apresenta uma maior susceptibilidade à penicilina comparativamente a *E. faecium* o que vai de acordo com os resultados obtidos. A maioria das resistências de *Enterococcus* à classe das penicilinas deve-se a modificações nas proteínas de ligação à penicilina (PBPs: penicilin-binding-proteins) e geralmente quando presentes referem-se a resistências adquiridas (Zapun *et al.*, 2008)

As percentagens de isolados resistentes ao antibiótico linezolida foram bastante elevadas para os 3 grupos de espécies, desde 83,1% no grupo *E. faecalis*, 95,8% no grupo *E. faecium* até aos 93,3% no grupo *E. casseliflavus*. A linezolida é o primeiro membro de uma nova classe de antimicrobianos sintéticos, as oxazolidinonas que são activas contra organismos Gram-positivos, incluindo *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

(MRSA) e *Enterococcus* resistentes à vancomicina (VRE). Apesar de estudos com isolados clínicos sugerirem que a resistência a este antibiótico é de desenvolvimento lento, têm já sido reportados *Enterococcus* resistentes à linezolida (Marshall *et al.*, 2002). Preocupante é ainda o facto de que no meio hospitalar tem sido relatada a facilidade de estirpes de *Enterococcus* para o desenvolvimento e disseminação da resistência à linezolida (Herrero *et al.*, 2002). Este antibiótico constitui de facto um importante agente no tratamento de infecções com *Enterococcus* multirresistentes, em contrapartida as terapias de longa duração frequentemente aplicadas podem conduzir à emergência de estirpes resistentes à linezolida (Klare *et al.*, 2003).

A resistência à eritromicina é matéria de controvérsia em diferentes estudos. Em Lopes (2005) foi registada uma elevada percentagem de estirpes de *E. faecalis* (74%) com resistência à eritromicina, enquanto em Kimiran-Erdem (2007) apenas 7% dos isolados foram resistentes. Neste estudo a resistência a eritromicina foi das mais elevadas, sendo de 98% para os 200 isolados. A acção dos antibióticos que pertencem à classe dos macrolídeos ocorre através da inibição da síntese proteica através da ligação nos receptores localizados na subunidade 50S do ribossoma, particularmente na molécula 23S do RNA, impedindo desta forma as reacções de transpeptidação e translocação. A resistência à eritromicina pode surgir por diminuição da permeabilidade da célula ao antimicrobiano ou ainda por alteração no local receptor da porção 50S do ribossoma e inactivação enzimática. Estudos anteriores sugerem que a emergência de *Enterococcus* resistentes a eritromicina pode constituir um resultado da exposição a este antimicrobiano (Arvanitidou *et al.*, 2001), na medida que o uso frequente e por longos períodos de tempo de eritromicina e de outros macrolídeos na comunidade pode ser responsabilizado pelas elevadas taxas de isolados resistentes observadas neste estudo.

A percentagem de isolados resistentes a quinopristina/dalfopristina foi muito elevada para os 3 grupos de espécies, 96,9% do grupo *E. faecalis*, 76,7% do grupo *E. faecium* e 60% do grupo *E. casseliflavus*. De facto, é reconhecido que *E. faecalis* é intrinsecamente resistente a quinopristina/dalfopristina (Bender *et al.*, 2009), o que foi confirmado pelos resultados deste estudo. O mecanismo de acção das estreptograminas está relacionado com a inibição da síntese proteica bacteriana por ligação a vários locais da subunidade 50S do ribossoma, que conduz à formação de um complexo quinopristina-ribossoma-dalfonopristina. Especificamente, a quinopristina inibe o alongamento da cadeia peptídica

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

ao inibir a translocação do mRNA durante o passo de alongamento da cadeia peptídica e a dalfonopristina interfere com a enzima peptidil transferase. Ambos os compostos inibem a formação de pontes peptídicas, resultando na formação de cadeias proteicas incompletas. O mecanismo de resistência mais importante é o mediado por plasmídeos, que confere resistência aos macrolídeos, lincosaminas e a quinopristina, mas não à dalfonopristina. A resistência pode também estar associada a acetiltransferases, por mecanismos que envolvem bombas de efluxo (Klare *et al.*, 2003).

As estreptograminas (quinopristina/dalfopristina) pertencem à mesma família dos macrolídeos (eritromicina) e lincosaminas e embora não possuam uma relação química apresentam algumas propriedades semelhantes, tais como o mecanismo de acção e o espectro antibacteriano. Neste grupo de antibióticos, existem também antibióticos estruturalmente semelhantes que já foram usados como promotores de crescimento em produção animal, tais como espiramicina, tilosina, estreptogramina A/B combinado com virginiamicina (Klare *et al.*, 2003). O uso, por vezes abusivo, destes antibióticos no passado provavelmente possibilitou a formação de reservatórios de bactérias resistentes, fora do meio hospitalar.

Os glicopéptidos vancomicina e teicoplanina são frequentemente utilizados como escolha para tratamento de infecções causadas por *Enterococcus* multirresistentes. Nas últimas décadas a resistência contra estes antibióticos tem desenvolvido um aumento na sua frequência em todo o mundo. Os glicopéptidos normalmente são indicados para estirpes de *Enterococcus* com resistência à ampicilina ou como alternativa à penicilina. A constatação de resistência contra glicopéptidos reduz drasticamente as possibilidades de terapêutica em infecções enterocócicas. A resistência a glicopéptidos por *Enterococcus* foi descrita pela primeira vez no Reino Unido e em França (Utley *et al.*, 1988; Leclercq *et al.*, 1988) mas hoje é encontrada em várias partes do mundo. Os glicopéptidos inibem a biossíntese da parede celular de bactérias Gram-positivo por ligação ao precursor de peptidoglicano provocando a inibição das subseqüentes transglicosilações. Os mecanismos de resistência enterocócica incluem modificação do alvo dos peptidoglicanos ou ainda dependência de glicopéptidos.

No que respeita a este trabalho foram registadas proporções de isolados resistentes à vancomicina muito elevadas, desde 53,3% no grupo *E. casseliflavus* até 75,4% no grupo *E. faecalis*, passando por 60% no grupo *E. faecium*. Em relação à teicoplanina as

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

percentagens de isolados resistentes são consideravelmente mais reduzidas, com 17,5% de isolados do grupo *E. faecium*, 29,2% do grupo *E. faecalis* e apenas 6,7% do grupo *E. casseliflavus*. O potencial de disseminação da resistência é um assunto importante uma vez que existe a possibilidade dos genes de resistência à vancomicina poderem ser transferidos entre espécies de *Enterococcus* e de *Enterococcus* para espécies de *Staphylococcus*. Os *Enterococcus* resistentes a vancomicina constituem um dos patogénicos mais preocupantes a nível hospitalar nos E.U.A, e têm vindo a aumentar nas instituições clínicas europeias, sendo Portugal uma das áreas com maior prevalência de VRE (Novais *et al.*, 2005). O uso de avoparcina na pecuária fora já associado ao aparecimento de isolados de VRE em diferentes fontes animais, no entanto a sua responsabilidade na emergência de GRE em diferentes fontes ambientais continua a ser alvo de controvérsia (Ogier e Serror, 2008).

A elevada percentagem de resistência a rifampicina (81,5%) é um facto controverso uma vez que em Portugal a rifampicina é quase exclusivamente usada no tratamento da tuberculose, no entanto de levar em consideração que a incidência de casos de tuberculose em Portugal é quase 4 vezes superior à da media europeia (Barbosa *et al.*, 2009).

Um dos factos importantes é igualmente a elevada percentagem de isolados totais resistentes à nitrofurantoína (60%), especialmente no grupo *E. faecium* (75%), sendo que se trata de um antibiótico pouco utilizado. No entanto, tem-se assistido a um recente uso massivo de furaltadona na produção de aves, podendo justificar a existência de contínua pressão selectiva para a emergência de resistência à nitrofurantoína (Costa *et al.*, 2006).

Neste estudo os isolados mostraram uma resistência reduzida aos aminoglicosídeos, nomeadamente quanto aos 200 isolados, 9,5% e 21% de *Enterococcus* spp. apresentaram-se resistentes a gentamicina e estreptomicina respectivamente. Estas percentagens contrastam com as obtidas em estudos clínicos onde segundo Gama (2008) cerca de 37% dos isolados demonstram resistência a aminoglicosídeos. No entanto, estes resultados vão de encontro aos obtidos num estudo levado a cabo por Costa (2006) onde *Enterococcus* spp. isolados de estações de tratamento de águas residuais, no que se refere ao município de Aveiro, cerca de 21% apresentaram-se resistentes a estreptomicina e apenas 3% a gentamicina.

Do ponto de vista clínico, as baixas taxas de resistência contra gentamicina, estreptomicina e penicilina é favorável na medida que as resistências contra estes

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

antibióticos reduzem drasticamente a possibilidade de terapêuticas em infecções enterocócicas. Estes aminoglicosídeos, embora sejam fármacos importantes e amplamente utilizados, são extremamente tóxicos o que limita a sua utilização. O seu efeito bactericida é exercido por interferirem com a síntese de proteínas, pela ligação à porção 16S rRNA da subunidade ribossomal 30S (Gama, 2008). O baixo nível de resistência a aminoglicosídeos deve-se a uma absorção dependente de energia para estes antibióticos na célula. *Enterococcus* não possuem enzimas do citocromo e dessa forma não é capaz de produzir a energia necessária pelo seu metabolismo, deste modo são intrinsecamente resistentes a aminoglicosídeos mas em baixo nível (Klare *et al.*, 2003).

Estudos anteriores (Peters *et al.*, 2003) sugerem que as quinolonas, classe da qual faz parte a ciprofloxacina, exibem apenas um reduzido efeito sobre *Enterococcus*. Klare (2003) refere igualmente que a maioria das estirpes de *Enterococcus* apenas apresentam susceptibilidades intermédias e várias estirpes são resistentes. O que se reflectiu neste estudo onde nos grupos de espécies representados a percentagem de isolados resistentes ultrapassou os 80%. A resistência a quinolonas baseia-se em mutações do gene *gyrA* (girase) e *pacC* (topoisomerase IV) (Klare *et al.*, 2003). Estas alterações podem ocorrer por mutação cromossómica nos genes que são responsáveis pelas enzimas alvo (DNA girase e topoisomerase IV) ou por alteração da permeabilidade à droga pela membrana celular bacteriana (porinas). É possível a existência de um mecanismo que envolva bombas de efluxo. Um aumento da utilização de antibióticos que são úteis para o tratamento de infecções por Enterobacteriaceae ou anaeróbios e contra os quais *Enterococcus* possuem resistências naturais ou apenas fracas susceptibilidades (como cefalosporinas e quinolonas como exemplo) podem conduzir à selecção e aumento de incidência de *Enterococcus* ou a superinfecções provocadas pelo género (Klare *et al.*, 2003). Este facto, constitui também uma das razões para o aumento da ocorrência de infecções hospitalares nos últimos 20-30 anos (Rice *et al.*, 2001).

A tetraciclina é frequentemente empregue na comunidade europeia ao nível de actividades como agricultura e aquaculturas, essencialmente como promotor de crescimento em países europeus (Huys *et al.*, 2004). No que se refere a humanos é amplamente utilizado em infecções do tracto urogenital, doenças periodontais e tratamento da acne. Segundo Roberts (2003) nos isolados clínicos de *Enterococcus* aproximadamente

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

65% apresentam-se resistentes a este antibiótico. A doxiciclina é um análogo de tetraciclina, tendo uma eficácia similar (Gama, 2008).

Neste estudo foram verificadas percentagens de isolados resistentes para ambos os antibióticos, sendo que *E. faecium* registou as mais altas percentagens (84,2% e 74,2% para tetraciclina e doxiciclina), seguindo-se *E. faecalis* (53,8% e 64,6%) e por fim *E. casseliflavus* (46,7% e 13,3%). Os antibióticos tetraciclina e doxiciclina pertencem à classe das tetraciclinas cujo mecanismo de acção refere-se a ligação reversível à subunidade 30S do ribossoma, bloqueando a ligação do RNA transportador o que acaba por impedir a síntese proteica. Segundo Klare (2003) a resistência a tetraciclinas é codificada por diferentes genes *tet* que são responsáveis por protecção ribossomal (redução de afinidade) ou por mecanismos de efluxo. Relativamente aos genes de resistência à tetraciclina, cerca de um total de 38 já foram caracterizados até à data, sendo que destes, 22 foram detectados em isolados bacterianos de ambientes aquáticos (Zhang *et al.*, 2009) o que pode demonstrar a elevada taxa de *Enterococcus* resistentes a tetraciclina relativa a este estudo.

Por muitas décadas o cloranfenicol foi a única droga realmente eficaz no tratamento de salmoneloses, inclusive a *Salmonella typhi*. No entanto o aumento de resistência a este agente, o reconhecimento de efeitos tóxicos e o desenvolvimento de novas drogas mais efectivas e menos tóxicas, restringiu muito o seu uso (Souza *et al.*, 2010). O cloranfenicol liga-se à subunidade 50S do ribossoma, inibindo a síntese proteica, no entanto os mecanismos de acção não estão ainda bem elucidados. Por sua vez a resistência pode ser adquirida através de plasmídeos ou alterações de permeabilidade ao agente antimicrobiano. Mais frequentemente, a resistência é determinada pela produção de uma enzima, acetiltransferase ou nitroreductase, que inactiva o composto. Em relação a amostras clínicas Gama (2008) refere que cerca de 50% das linhagens de *Enterococcus* são resistentes. No que concerne a este estudo foram verificadas elevadas percentagens de isolados resistentes ao cloranfenicol, desde 64,6% e 73,3% de isolados do grupo *E. faecalis* e *E. casseliflavus* respectivamente, atingindo os 91,7% de isolados de *E. faecium*. Tais resultados podem apontar que apesar das restrições na sua aplicação ainda é detectada a presença de enterococos resistentes a este fármaco no ambiente aquático da Ria de Aveiro, podendo indicar que ainda é exercida pressão selectiva sobre estas bactérias.

No presente estudo foi ainda registada resistência a fosfomicina, mas neste caso em percentagens consideravelmente reduzidas, 13,3% dos isolados de *E. faecium*, e apenas

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

3,1% de *E. faecalis*, sendo que nenhum dos isolados de *E. casseliflavus* mostrou resistência a este antibiótico. A fosfomicina é um antibiótico particularmente eficaz no tratamento das Infecções do Tracto Urinário (ITUs). Apresenta elevada actividade bactericida, de amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, abrangendo estirpes produtoras de penicilinas e bactérias mais frequentemente isoladas em ITUs. Estes antibióticos inibem a síntese da parede celular competindo ou inibindo as enzimas envolvidas nessa síntese (Majiduddin *et al.*, 2002). A resistência bacteriana a fosfomicina pode ser de origem cromossómica ou mediada por plasmídeos, sendo que neste caso envolve a conjugação de fosfomicina e glutatona formando um composto inactivo. As mutações cromossómicas alteram o transporte do antimicrobiano para o interior da célula bacteriana, localizadas nos genes cromossómicos *glpT* e *uhpT*. Podem igualmente ocorrer inactivações devido a mutações de sua enzima alvo, a fosfoenolpiruvato transferase, incapaz de distinguir entre o seu substrato e a fosfomicina. Vários estudos demonstraram que a fosfomicina apresenta um menor índice de resistência em isolados de *E. coli* e *E. faecalis* comparativamente a outros grupos de antibióticos frequentemente usados no tratamento de ITUs. Num estudo de Fuchs (1999) onde foram recolhidos dados de sensibilidade recolhidos nos Estados Unidos de 10 centros hospitalares demonstraram que num total de 157 amostras foi registada uma percentagem de 97,5% de sensibilidade a fosfomicina em *E. faecalis*.

Em conclusão pode-se afirmar que neste estudo foram reveladas elevadas percentagens de isolados de *Enterococcus* sp. resistentes a um grupo de 15 antibióticos, sendo que 99% provavelmente constituem microrganismos multirresistentes. Este facto somado à constatação da emergência de *Enterococcus* como um dos principais patogénicos responsáveis por infecções nosocomiais nos E.U.A e na Europa confere uma importância relevante aos resultados obtidos.

Segundo Valenzuela (2010) *Enterococcus* tem adquirido genes de resistência a antibióticos em plasmídeos ou transposões de outros organismos ou ainda por mutações espontâneas que fornecem a estas bactérias um nível reforçado de resistência. Devido à forte poluição de que sofre a Ria de Aveiro é de facto possível que bactérias fecais resistentes a antibióticos, provenientes de esgotos domésticos ou tendo origem em descargas de fontes contaminantes como indústrias associadas a produção animal, frequentes neste local, possam transferir os seus determinantes de resistência a antibióticos

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

à microbiota de moluscos, promovendo a sua disseminação e prevalência em ambientes marinhos. As bactérias comensais resistentes constituem um reservatório de genes de resistência para bactérias patogénicas facultativas ou obrigatórias podendo transferir os genes de resistência para outras bactérias mais virulentas e mais propensas a causar doenças em humanos (Barreto *et al.*, 2009).

O uso abusivo e cada vez mais frequente de antibióticos em humanos e na medicina veterinária, bem como nas aquaculturas e agriculturas conduzem a contaminação de águas e do solo, causando por sua vez alterações nos ecossistemas microbianos e ainda podem constituir a causa de selecção e disseminação de organismos resistentes a antibióticos (Schwartz *et al.*, 2003). As descargas hospitalares podem igualmente ser um dos principais causadores das elevadas percentagens de resistência, especialmente no que se refere aos antibióticos como vancomicina, eritromicina e ciprofloxacina, com elevada utilização nos meios clínicos (Costa *et al.*, 2006). As tetraciclina são também extensivamente usadas em produção animal (Michalova *et al.*, 2004), mantendo desta forma um reservatório de organismos resistentes que podem de facto ser transferidos para humanos.

Os resultados do presente estudo sugerem que os berbigões que se desenvolvem nas águas costeiras, nomeadamente na Ria de Aveiro, podem constituir potenciais reservatórios de *Enterococcus* multirresistentes a antibióticos, existindo a possibilidade de contribuírem para a sua disseminação e ainda de atingirem a comunidade por reentrarem na cadeia alimentar. As elevadas taxas de resistência a eritromicina, vancomicina, ciprofloxacina, tetraciclina, linezolida, quinopristina/dalfopristina, rifampicina e cloranfenicol, antibióticos de uso corrente no tratamento de infecções humanas e na produção animal suscitam preocupação e a necessidade de monitorização de ambientes aquáticos de elevada importância económica como o é a Ria de Aveiro.

REFERÊNCIAS

1. Alcântara, F. & Almeida, A. Coliformes no canal de Mira: comparação dos teores na água, no sedimento e em *Cardium edule*, L. Variação geográfica e flutuação sazonal. *Revista de Biologia da Universidade Aveiro* **2**, 87-105(1988).
2. Angeletti, S. et al. Routine Molecular Identification of Enterococci by Gene-Specific PCR and 16S Ribosomal DNA Sequencing. *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 794-797(2001).
3. Araújo, C. et al. Vancomycin-resistant enterococci from Portuguese wastewater treatment plants. *Journal of Basic Microbiology* **50**, 605-609(2010).
4. Arvanitidou, M., Katsouyannopoulos, V. and Tsakris, A. Antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from coastal bathing waters. *J Med Microbiol* **50**, 1001-1005(2001).
5. Baele, M. et al. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 4201-4207(2000).
6. Baker-Austin, C. et al. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology* **14**, 176-182(2006).
7. Barbosa, J., Ferreira, V. & Teixeira, P. Antibiotic susceptibility of enterococci isolated from traditional fermented meat products. *Food Microbiology* **26**, 527-532(2009).
8. Barreto, A. et al. Detection of antibiotic resistant *E. coli* and *Enterococcus* spp. in stool of healthy growing children in Portugal. *Journal of Basic Microbiology* **49**, 503-512(2009).
9. Bejuk, D. et al. Evaluation of phenotypic characteristics for differentiation of enterococcal species using an example based algorithm. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **38**, 201-205(2000).
10. Bender E. A, Freitas A. L. P., Reiter K. C., Lutz L., B.A.L. Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **40**, 693-700(2009).
11. Butaye, P., Devriese, L.A. & Haesebrouck, F. Differences in antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* strains isolated from

- farm and pet animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**, 1374-1378(2001).
12. Butt, A.A., Aldridge, K.E. & Sanders, C.V. Infections related to the ingestion of seafood Part I: Viral and bacterial infections. *The Lancet infectious diseases* **4**, 201-212(2004).
 13. Carvalho, M.D.G.S. et al. *Enterococcus caccae* sp. nov., isolated from human stools. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 1505-1508(2006).
 14. Cerejo, M. & Dias, J.M. Tidal transport and dispersal of marine toxic microalgae in a shallow, temperate coastal lagoon. *Marine Environmental Research* **63**, 313-340(2007).
 15. Chun, J. et al. EzTaxon: a web-based tool for the identification of prokaryotes based on 16S ribosomal RNA gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2259-61(2007).
 16. Clinical and Laboratory Standart Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Twentieth edition; M100-S20. Fevereiro 2010 update. Clinical and Laboratory Standart Institute, Wayne, PA. (2010).
 17. Cocconcelli, P. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 315-323(2003).
 18. Coleri, A. et al. Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids of clinical *Enterococcus* species. *The Journal of general and applied microbiology* **50**, 213-219(2004).
 19. Costa, P. Ecologia das antibiorresistências em *Enterococcus* spp. e *Escherichia coli*. Dissertação de Doutoramento em Ciências Biomédicas. Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar. Universidade do Porto. (2006).
 20. Croci, L. et al. Effects of depuration of molluscs experimentally contaminated with *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* 01 and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Applied Microbiology* **92**, 460-465(2002).
 21. Davis, D.R. et al. *Enterococcus faecalis* multi-drug resistance transporters: application for antibiotic discovery. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **3**, 179-184(2001).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

22. Lopes, M.F. et al. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology* **103**, 191-198(2005).
23. Devriese, L.A., Pot, B. & Collins, M.D. Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *The Journal of applied bacteriology* **75**, 399-408(1993).
24. Devriese, L.U.C., Baele, M. & Butaye, P. The Genus *Enterococcus* : Taxonomy. *Prokaryotes* **4**, 163-174(2006).
25. Duh, R. W., K. V. Singh, K. Malathum, and B.E.M. In vitro activity of 19 antimicrobial agents against enterococci from healthy subjects and hospitalized patients and use of an ace gene probe from *Enterococcus faecalis* for species identification. *Microb. Drug Resist* **7**, 39-46(2001).
26. Eaton, T.J. & Gasson, M.J. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1628-1635(2001).
27. Facklam, R.R. & Collins, M.D. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *Journal of Clinical Microbiology* **27**, 731-734(1989).
28. Ferreira Da Silva, M. et al. Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *Fems Microbiology Ecology* **60**, 166-176(2007).
29. Fortina, M.G. et al. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1717-1721(2004).
30. Moreno, F. et al. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 214-229(2003).
31. Moreno, F. et al. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 1-24(2006).
32. Franz, C.M.A.P., Holzapfel, W.H. & Stiles, M.E. Enterococci at the crossroads of food safety? *International Journal of Food Microbiology* **47**, 1-24(1999).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

33. Franz, C.M.A.P. et al. Enterococci in foods--a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 105-122(2003).
34. Freitas, A.R. et al. Dispersion of Multidrug-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates Belonging to Major Clonal Complexes in Different Portuguese Settings. *Applied and Environmental Microbiology* **75**, 4904-4908(2009).
35. Fuchs, P.C., Barry, A.L. & Brown, S.D. Fosfomycin tromethamine susceptibility of outpatient urine isolates of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* from ten North American medical centres by three methods. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **43**, 137-140(1999).
36. Gama, B.A. Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de *Enterococcus* spp. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular. Universidade Federal Rio Grande do Sul. (2008).
37. Garcia, S. et al. The effect of wastewater treatment on antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Enterococcus* sp. *Water environment research a research publication of the Water Environment Federation* **79**, 2387-2395(2007).
38. Giraffa, G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiology Reviews* **26**, 163-171(2002).
39. Goh, S.H. et al. Identification of *Enterococcus* Species and Phenotypically Similar *Lactococcus* and *Vagococcus* Species by Reverse Checkerboard Hybridization to Chaperonin 60 Gene Sequences. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3953-3959(2000).
40. Harwood, V.J. et al. Molecular confirmation of *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* from clinical, faecal and environmental sources. *Letters in Applied Microbiology* **38**, 476-482(2004).
41. Herrero, I.A., Issa, N.C. & Patel, R. Nosocomial spread of linezolid-resistant, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *The New England Journal of Medicine* **346**, 867-869(2002).
42. Hurst, C.J. et al. Manual of environmental microbiology. 1293(2007).
43. Huys, G. H., K. D'Haene, J. M. Collard, and J.S. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 1555-1562(2004).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

44. Jackson CH., Fedorka-Cray P.J., B.J.B. Use of a genus- and species-specific multiplex PCR for identification of enterococci. . *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 3558–3565(2004).
45. Johnston, L.M. & Jaykus, L.-A. Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Produce. *Applied and Environmental Microbiology* **70**, 3133-3137(2004).
46. Kariyama, R. et al. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 3092-3095(2000).
47. Kimiran-Erdem, A. et al. Isolation and identification of enterococci from seawater samples: assessment of their resistance to antibiotics and heavy metals. *Environmental Monitoring and Assessment* **125**, 219-228(2007).
48. Klare, I. et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 269-290(2003).
49. Klein, G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 123-131(2003).
50. Knudtson, L.M. & Hartman, P.A. Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 3027-3031(1992).
51. Koort, J. et al. *Enterococcus hermanni* sp. nov., from modified-atmosphere-packaged broiler meat and canine tonsils. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, 1823-1827(2004).
52. Kusuda, R; Kawai, K; Salati, F; Banner, C. R. and Fryer, J.L. *Enterococcus seriolicida* sp. nov., a fish pathogen. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 406-409(1991).
53. Lauková, A. & Juris, P. Distribution and characterization of *Enterococcus* species in municipal sewages. *Microbios* **89**, 73-80(1997).
54. Leclercq, R. et al. Transferable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**, 10-15(1989).
55. Lee, C.-Y., Panicker, G. & Bej, A.K. Detection of pathogenic bacteria in shellfish using multiplex PCR followed by CovaLink NH microwell plate sandwich hybridization. *Journal of Microbiological Methods* **53**, 199-209(2003).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

56. Lees, D. Viruses and bivalve shellfish. *International Journal of Food Microbiology* **59**, 81-116(2000).
57. Licht, T.R. et al. Transfer of the pheromone-inducible plasmid pCF10 among *Enterococcus faecalis* microorganisms colonizing the intestine of mini-pigs. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 187-193(2002).
58. Liu, D. et al. PCR amplification of a species-specific putative transcriptional regulator gene reveals the identity of *Enterococcus faecalis*. *Research in Microbiology* **156**, 944-948(2005).
59. Lopes, M.F., Ribeiro, T., Abrantes, M., Marques, J.J., Tenreiro, R. e Crespo, M.T. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *International Journal of Food Microbiology* **103**, 191-198(2005).
60. Lund, B. et al. Impact on human intestinal microflora of an *Enterococcus faecium* probiotic and vancomycin. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **32**, 627-632(2000).
61. Majiduddin, F.K., Materon, I.C. & Palzkill, T.G. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International journal of medical microbiology IJMM* **292**, 127-137(2002).
62. Manero, A. & Blanch, A.R. Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4425-4430(1999).
63. Marshall, S.H. et al. Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**, 3334-3336(2002).
64. Martins Da Costa, P.M., Vaz-Pires, P.M. & Bernardo, F.M. Antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. isolated from wastewater and sludge of poultry slaughterhouses. *Journal of environmental science and health Part B Pesticides food contaminants and agricultural wastes* **41**, 1393-1403(2006).
65. Martins Da Costa, P., Vaz-Pires, P. & Bernardo, F. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. isolated in inflow, effluent and sludge from municipal sewage water treatment plants. *Water Research* **40**, 1735-1740(2006).
66. Mater, D.D.G. et al. Evidence of vancomycin resistance gene transfer between enterococci of human origin in the gut of mice harbouring human microbiota. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **56**, 975-978(2005).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

67. Michalova, E; Novotna, P; Schlegelova, J. Tetracyclines in veterinary medicine and bacterial resistance to them. *Veterinarni Medicina* **49**, 79-100(2004).
68. Monteiro, L.M.P.S. Estudo da eficácia da depuração na redução da contaminação bacteriológica do mexilhão (*Mytilus* spp.) e sua viabilidade. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto (2004).
69. Moreno, F; Callewaert, R; Devreese, B; Van Beeumen, J. and De Vuyst, L. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by enterococci from different sources. *Journal of Applied Microbiology*, **94**, 214-229(2003).
70. Mossel, D.A.A. Streptococci of Lancefields group-D in foods—their significance, enumeration and control. *Archiv fur Lebensmittel-Hygiene* **29**, 121-127(1978).
71. Naser, S. et al. Phylogeny and Identification of Enterococci by atpA Gene Sequence Analysis. *Society* **43**, 2224-2230(2005).
72. Naser, S.M. et al. *Enterococcus canintestini* sp. nov., from faecal samples of healthy dogs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 2177-2182(2005).
73. Naïmi, A., Beck, G. & Branlant, C. Primary and secondary structures of rRNA spacer regions in enterococci. *Microbiology* **143** (Pt 3, 823-834(1997).
74. Noble, W.C., Virani, Z. & Cree, R.G. Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from *Enterococcus faecalis* NCTC 12201 to *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* **72**, 195-198(1992).
75. Novais, C. et al. High occurrence and persistence of antibiotic-resistant enterococci in poultry food samples in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **56**, 1139-1143(2005).
76. Novais, C. et al. Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. *Clinical microbiology and infection the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **12**, 1131-1134(2006).
77. Novais, C. et al. Environmental Contamination with Vancomycin-Resistant Enterococci from Hospital Sewage in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology* **71**, 3364-3368(2005).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

78. Novais, C. et al. Local Genetic Patterns within a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Clone Isolated in Three Hospitals in Portugal. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**, 3613-3617(2004).
79. Ogier, J.-C. & Serror, P. Safety assessment of dairy microorganisms: the *Enterococcus* genus. *International Journal of Food Microbiology* **126**, 291-301(2008).
80. Oliveira, J. et al. Microbial contamination and purification of bivalve shellfish: Crucial aspects in monitoring and future perspectives – A mini-review. *Food Control* **22**, 805-816(2011).
81. Ozawa, Y., Courvalin, P. & Gaiimand, M. Identification of enterococci at the species level by sequencing of the genes for D-alanine:D-alanine ligases. *Systematic and applied microbiology* **23**, 230-237(2000).
82. Pangallo, D. et al. Assessment of environmental enterococci: bacterial antagonism, pathogenic capacity and antibiotic resistance. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**, 555-562(2008).
83. Patel, R. et al. Determination of 16S rRNA Sequences of Enterococci and Application to Species Identification of Nonmotile *Enterococcus gallinarum* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology* **36**, 3399-3407(1998).
84. Paulsen, I.T. et al. Role of mobile DNA in the evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Science* **299**, 2071-2074(2003).
85. Peters, J., Mac, K., Wichmann-Schauer, H., Klein, G. & Ellerbroek, L. Species distribution and antibiotic resistance patterns of enterococci isolated from food of animal origin in Germany. *Int J Food Microbiol* **88**, 311-314(2003).
86. Poeta, P. et al. Antimicrobial resistance and the mechanisms implicated in faecal enterococci from healthy humans, poultry and pets in Portugal. *International Journal of Antimicrobial Agents* **27**, 131-137(2006).
87. Poyart, C., Quesnes, G. & Trieu-Cuot, P. Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *Journal of Clinical Microbiology* **38**, 415-418(2000).
88. Radhouani, H. et al. Proteomic characterization of vanA-containing *Enterococcus* recovered from Seagulls at the Berlengas Natural Reserve, W Portugal. *Proteome Science* **8**, 48(2010).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

89. Rebelo, F. O risco de sedimentação na laguna de Aveiro: Leitura actual de um texto de Amorim Girão (1922). *Territorium* **14**, 63-70(2007).
90. Rice, L.B. Emergence of vancomycin-resistant enterococci. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 183-187(2001).
91. Roberts, M.C., Moncla, B.J. & Hillier, S.L. Characterization of unusual tetracycline-resistant gram-positive bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 2655-2657(1991).
92. Sadowsky, M.J. & Domingo, J.W.S. *Microbial source tracking*. ASM Press: Washington DC, USA (2007).
93. Sakai, Y., Tsukahara, T. and Ushida, K. Isolation of vancomycin-resistant enterococci from pigs in Japan. *Animal Science Journal* **74**, 521-523(2003).
94. Schleifer, K.H. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* **46**, 201-203(1987).
95. Schleifer, K.H. & Kilpper-Balz, R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **34**, 31-34(1984).
96. Schwartz, T. et al. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *Fems Microbiology Ecology* **43**, 325-335(2003).
97. Semedo, T. et al. Virulence factors in food, clinical and reference Enterococci: A common trait in the genus? *Systematic and applied microbiology* **26**, 13-22(2003).
98. Sessions, V.A., Lovegrove, J.A., Taylor, G.R.J., Dean, T.S., Williams, C.M., Sanders, T.A.B., MacDonald, I.A., and Salter, A.M. The effect of a new fermented milk product on total plasma cholesterol, LDL-cholesterol, and apolipoprotein B concentrations in middle-aged men and women (abstract 285). In: Sadler, M.J., Saltmarch, M. (Eds.), *121 Functional Foods: the consumer, the product, and the evidence*. The Royal Society of Chemistry, London, 15-19(1997).
99. Shankar, N., Baghdayan, A.S. & Gilmore, M.S. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* **417**, 746-750(2002).
100. Sherman, J.M. The Streptococci. *Bacteriological Reviews* **1**, 3-97(1937).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

101. Slanetz, L.W. & Bartley, C.H. Numbers of enterococci in water, sewage, and feces determined by the membrane filter technique with an improved medium. *Journal of Bacteriology* **74**, 591-595(1957).
102. Sobral, M.P.V. & Sobral, F. Zonas de Produção de Moluscos Bivalves da Ria de Aveiro. In: *Ipimar Divulgação* N° 12 / Julho de 2000.
103. Souza, B. P; Magnani, M; Oliveira, T. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp. *Semina: Ciências Agrárias* **31**, 413-428(2010).
104. Stepanauskas, R. et al. Elevated microbial tolerance to metals and antibiotics in metal-contaminated industrial environments. *Environmental science technology* **39**, 3671-3678(2005).
105. Sukontasing, S. et al. *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **57**, 2151-2154(2007).
106. Svec, P. et al. Evaluation of (GTG)-PCR for identification of *Enterococcus* spp. *FEMS Microbiology Letters* **247**, 59-63(2005).
107. Svec, P. et al. *Enterococcus aquimarinus* sp. nov., isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 2183-2187(2005).
108. Svec, P. et al. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **55**, 2479-2484(2005).
109. Svec, P. et al. *Enterococcus silesiacus* sp. nov. and *Enterococcus termitis* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **56**, 577-581(2006).
110. Tanasupawat, S., Sukontasing, S. & Lee, J.-S. *Enterococcus thailandicus* sp. nov., isolated from fermented sausage ('mum') in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **58**, 1630-1634(2008).
111. Tyrrell, G.J. et al. *Enterococcus gilvus* sp. nov. and *Enterococcus pallens* sp. nov. Isolated from Human Clinical Specimens. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 1140-1145(2002).
112. Uttley A.H.C., Collins C.H., Naidoo J., G.R.C. Vancomycin- resistant enterococci. *The Lancet* **I** 57-58(1988).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

113. Valenzuela, A.S. et al. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiology* **27**, 955-961(2010).
114. Valenzuela, A.S. et al. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. *Food Control* **20**, 381-385(2009).
115. Vancanneyt, M. et al. *Enterococcus villorum* sp. nov., an enteroadherent bacterium associated with diarrhoea in piglets. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, 393-400(2001).
116. Versalovic, J. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence based PCR (rep-PCR). *MethCell Mol Biol* **5**, 25-40(1994).
117. Vincent, S. et al. Vancomycin resistance in *Enterococcus gallinarum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **36**, 1392-1399(1992).
118. Wilson, I.G. & Moore, J.E. Presence of Salmonella spp. and Campylobacter spp. in shellfish. *Epidemiology and Infection* **116**, 147-153(1996).
119. Xu, Z. et al. First report of class 2 integron in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integron in *Enterococcus faecium* in South China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **68**, 315-317(2010).
120. Yu, D. et al. Effects of administration mode of antibiotics on antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* in aquatic ecosystems. *Chemosphere* **76**, 915-920(2009).
121. Zapun, A., Contreras-Martel, C. and Vernet, T. Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance. *FEMS Microbiology Reviews* **32**, 361-385(2008).
122. Zhang, X.-X., Zhang, T. & Fang, H.H.P. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology* **82**, 397-414(2009).

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

ANEXO 1 - Resultados obtidas na caracterização dos 200 isolados de *Enterococcus* spp., incluindo as identificações dos isolados por grupo de espécie, os testes bioquímicos e os testes de susceptibilidade a antibióticos pelo método de difusão em disco.

Isolados		Identificação do grupo de espécie	Testes bioquímicos				Susceptibilidade a antibióticos														
nº	Código		MAN	PIG	ARA	GLU	P	VA	TEC	E	TE	DO	CIP	F	RD	FOT	C	QD	LZD	CN	S
E1	L2C2	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S
E2	L5B1-1	<i>E. faecium</i>	NEG	POS	NEG	POS	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E3	L5B1-2	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
E4	L5A1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E5	L5B1-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S
E6	L5B2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	S
E7	L5B3-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E8	L5B3-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S
E9	L5C1	<i>E. faecium</i>	NEG	POS	NEG	POS	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
E10	L5C3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
E11	L6A2	<i>E. faecium</i>	NEG	POS	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E12	L6C1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E13	L5D2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
E15	L7A2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
E16	L7C2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E17	L8D2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E18	L8C3	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E20	L5D2-2	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	POS	POS	S	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E22	L5B1-5	<i>E. casseliflavus</i>	NEG	NEG	POS	POS	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
E23	L5B1-6	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

E26	L2A3	<i>E. casseliflavus</i>	POS	POS	POS	POS	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	R	S
E29	L5C1-4	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E33	L10B1-2	<i>E. faecium</i>	NEG	POS	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E34	L11A2-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E35	L11A2-2	<i>E. casseliflavus</i>	NEG	POS	POS	POS	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
E36	L9C1-1	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E37	L9C1-2	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E38	L9C1-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E39	L11D1-1	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E42	L9B1	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	POS	POS	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E43	L9A1-1	<i>E. faecium</i>	POS	POS	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R
E44	L9A1-2	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E45	L9A1-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E46	L9A1-4	<i>E. casseliflavus</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
E47	L9A1-5	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R
E48	L9A1-6	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E49	L9D1-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E50	L9D1-2	<i>E. faecium</i>	NEG	POS	NEG	POS	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E51	L9D1-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E53	L9D1-5	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E55	L9A3-1	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E57	L9A3-3	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	POS	POS	S	S	R	R	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S
E58	L9A3-4	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E61	L9A3-7	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	R
E63	L9A3-9	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E64	L9A3-10	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

E65	L9A3-11	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S
E66	L9C2-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
E68	L9C2-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S
E69	L9C2-4	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
E70	L9C2-5	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E72	L9C2-7	<i>E. faecium</i>	NEG	POS	NEG	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S
E75	L9D2-1	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E76	L9D2-2	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E77	L9D2-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S
E78	L9D2-4	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R
E79	L9D2-5	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E80	L9D2-6	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E81	L9D2-7	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S
E82	L9D2-8	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
E83	L9D2-9	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E84	L9D3-1	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E85	L9D3-2	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R
E86	L9D3-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E87A	L9D3-4	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E87B	L9D3-4	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E88	L9D3-5	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E89	L9D3-6	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R
E90	L9D3-7	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R
E93	L9D3-10	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	R	S	R
E94	L9D3-11	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E95	L9D3-12	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

E96	L9D3-13	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E97	L9D3-14	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E98	L9D3-15	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S
E100	L9C3-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E101	L9C3-3	<i>E. faecalis</i>	POS	POS	NEG	NEG	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E102	L9C3-4	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E103	L9C3-5	<i>E. faecium</i>	POS	POS	NEG	POS	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E104	L9C3-6	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E105	L9C3-7	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
E106	L9C3-8	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E107	L9C3-9	<i>E. casseliflavus</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E108	L9C3-10	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	POS	POS	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E109B	L9C3-11	<i>E. faecium</i>	pos	NEG	POS	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S	R
E109BR	L9C3-11	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E110	L9C3-12	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S	R	S	R	R	R
E112	L13A1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E113	L14C1	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E116	L4D2-1	<i>E. faecium</i>	NEG	POS?	NEG	POS	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
E117	L4D2-2	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E119	L13D3-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S
E120	L13D3-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S
E121	L13D3-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E126	L13C3-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S
E127	L13C3-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	R	R	S	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E129	L12D2-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E132	L1C2-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

E133	L1C2-2	<i>E. casseliflavus</i>	POS?	POS	POS	POS	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R
E134	L1D3-1	<i>E. casseliflavus</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
E135	L1D3-2	<i>E. casseliflavus</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S
E137	L12A2-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S
E138	L12A2-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E139	L4C2-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S
E140	L4C2-2	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E141	L4C2-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E142	L4C2-4	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E144	L4C3-2	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
E145	L4C3-3	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E149	L4A1-1	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E150	L4A1-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E151	L4A1-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
E152	L4A1-4	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
E154	L4A1-6	<i>E. casseliflavus</i>	POS	POS	POS	POS	S	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E156	L4A2-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E159	L4A2-4	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S
E160	L4A2-5	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E161	L4A2-6	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	R	S	S
E162	L4A2-7	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
E163	L4B2-1	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E165	L4B2-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R
E167	L4B2-5	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S
E169	L4B2-7	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S
E170	L1A3-1	<i>E. casseliflavus</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	R	S	R	S	S

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

E171	L1A3-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E172	L1A3-3	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E173	L1A3-4	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R
E174	L1A3-5	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E178	L1D2-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R
E179	L1D2-2	<i>E. faecium</i>	POS	POS	POS	POS	R	S	S	R	R	S	R	S	S	R	S	S	R	S	S
E180	L1D2-3	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E181	L1D2-4	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E182	L1D2-5	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
E184	L12B1-1	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E185	L12B1-2	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E186	L12B1-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E190	L13C1-2	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E192	L13C1-4	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E193	L13C1-5	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E204	L4B1-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R
E205	L4B1-4	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E206	L4B1-5	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S
E211	L4C1-1	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	NEG	NEG	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E213	L4C1-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
E214	L4C1-4	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	S	S
E215	L4C1-5	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E222	L4C1-12	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S
E226	L4A3-4	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
E227	L4A3-5	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E228	L4A3-6	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	S	S	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

E231	L4A3-9	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S
E232	L4A3-10	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	NEG	NEG	R	S	S	R	S	S	S	R	S	R	R	S	R	S	S
E234	L1B1	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
E237	L1C3	<i>E. casseliflavus</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	S	S
E238	L4D1-1	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S
E239	L4D1-2	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
E240	L4D1-3	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S
E241	L4D1-4	<i>E. casseliflavus</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
E242	L4D1-5	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E244	L4D1-7	<i>E. faecalis</i>	pOS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S
E246	L4D1-9	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	POS	S	S	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E247	L4D1-10	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S
E248	L4D1-11	<i>E. casseliflavus</i>	POS	POS	POS	POS	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E253	L4D1-16	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
E254	L4D1-17	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S
E255	L4D1-18	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E256	L4D1-19	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	R	S	S	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E257	L4D1-20	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E258	L4D1-21	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S
E259	L4D1-22	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	R
E261	L4D1-24	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	POS	NEG	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E262	L4D1-25	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E264	L4D1-27	<i>E. casseliflavus</i>	POS	POS	POS	POS	R	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E265	L4D1-28	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E267	L4D1-30	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E268	L4D1-31	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	S

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

E269	L4D1-32	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R
E270	L4D3-1	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E271	L4D3-2	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
E275	L4D3-6	<i>E. casseliflavus</i>	POS	POS	POS	POS	S	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S
E276	L4D3-7	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	S	S
E277	L4D3-8	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	R	S	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E278	L4D3-9	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R
E279	L4D3-10	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	S	S	S	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	S
E280	L4D3-11	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
E281	L4D3-12	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E282	L4D3-13	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	S
E283	L4D3-14	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
E284	L4D3-15	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S
E285	L4D3-16	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
E286	L4D3-17	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	R	S	R	R	R	R	R	S	R	S	S
E287	L4D3-18	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	S	S	R	S	S	S	R	R	S	S	R	R	S	S
E290	L4D3-21	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S
E292	L4D3-23	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	POS	S	S	S	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	S
E293	L4D3-24	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R
E294	L4D3-25	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	S	S
E295	L4D3-26	<i>E. faecium</i>	NEG	NEG	NEG	POS	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S
E296	L4D3-27	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	NEG	NEG	S	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	S	S
E300	L4D3-31	<i>E. faecalis</i>	POS	NEG	POS	NEG	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	R
E301	L4D3-32	<i>E. faecium</i>	POS	NEG	POS	POS	R	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S

Legenda: (R) resistente, (S) susceptível, termos atribuídos de acordo com as normas de CLSI.

Caracterização de *Enterococcus* isolados de berbigão na Ria de Aveiro

ANEXO 2 – Percentagens de isolados resistentes aos 15 antibióticos utilizados, incluindo resistências totais dos 200 isolados, por grupo de espécies e ainda por local de amostragem.

Resistências (%) por grupo de espécies															
Antibióticos:	P	VA	TEC	E	TE	DO	CIP	F	RD	FOT	C	QD	LZD	CN	S
Resistências totais (n=200)	24,5	64,5	20,5	98	71,5	66,5	87	60	81,5	9	72	82	91,5	9,5	21
<i>E. faecium</i> group (n=120)	35,8	60	17,5	99,2	84,2	74,2	91,7	75	76,7	13,3	78,3	76,7	96,8	12,5	24,2
<i>E. faecalis</i> group (n=65)	7,7	75,4	29,2	98,5	53,8	64,6	81,5	36,9	95,4	3,1	64,6	96,9	83,1	4,6	18,5
<i>E. casseliflavus</i> group (n=15)	6,7	53,3	6,7	86,7	46,7	13,3	73,3	40	60	0	53,3	60	93,3	6,7	6,7
Resistências (%) por local de amostragem															
Local 1 (n=16)	31,3	56,3	12,5	100	62,5	56,3	87,5	50	56,3	12,5	56,3	87,5	93,8	6,3	37,5
Local 2 (n=2)	50	100	0	100	50	50	100	100	50	0	50	0	100	50	0
Local 3 (n=0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Local 4 (n=79)	17,7	53,2	8,9	97,5	72,2	48,1	74,7	48,1	83,5	12,7	58,2	81	83,5	2,5	15,2
Local 5 (n=14)	42,9	85,7	28,6	100	92,9	85,7	100	71,4	71,4	21,4	92,9	64,3	85,7	28,6	28,6
Local 6 (n=2)	50	50	0	100	100	50	100	100	100	0	100	100	100	0	0
Local 7 (n=2)	50	50	0	100	100	50	100	100	50	0	50	100	100	0	0
Local 8 (n=2)	50	50	0	100	100	100	100	50	100	0	50	100	100	0	0
Local 9 (n=61)	26,2	67,2	34,4	98,4	60,7	83,6	96,7	68,9	85,2	4,9	85,2	82	100	8,2	29,5
Local 10 (n=1)	0	100	0	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	0	0
Local 11 (n=3)	33,3	66,6	33,3	100	66,6	66,6	66,6	100	100	0	66,6	100	100	0	0
Local 12 (n=6)	0	100	33,3	100	66,6	66,6	100	50	83,3	0	83,3	100	100	0	0
Local 13 (n=11)	27,3	72,7	27,3	100	81,8	90,9	81,8	54,5	90,9	9,1	72,7	81,8	90,9	18,2	9,1
Local 14 (n=1)	0	100	0	100	100	100	100	100	0	0	100	100	100	0	0
Local 15 (n=0)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: (n) indica o número de isolados em cada análise. As resistências são dadas em percentagem (%) de isolados resistentes ao antibiótico em causa.